



Universidade Nova de Lisboa

**Estudos do efeito da Proteína Recombinante
Akirin na Infecção por *Plasmodium berghei* em
Anopheles gambiae s.s.**

Mário João Amaro da Costa

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA

Outubro, 2012



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Estudos do efeito da Proteína Recombinante Akirin na
Infecção por *Plasmodium berghei* em *Anopheles gambiae* s.s.**

Mário João Amaro da Costa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica

Orientador:

Prof. Doutora Ana Domingos (UEIPM/IHMT/UNL)

Coorientador:

Prof. Doutor Henrique Silveira (UEIPM /IHMT/UNL)

Outubro, 2012

*Em tua memória,
porque grande parte
do que sou hoje se deve a ti...*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Doutora Ana Domingos, por todos os ensinamentos transmitidos, pela ajuda na solução de todos os problemas, por me ter feito “crescer” enquanto investigador e pessoa, e por me ter ajudado a manter a calma quando as coisas não corriam como esperado. Obrigado por toda a paciência, preocupação e conselhos.

Ao meu coorientador Doutor Henrique Silveira, por todos os ensinamentos transmitidos neste “mundo” que é a Malária, por todas as críticas/sugestões e pela paciência que teve durante todo este ano de trabalho.

Ao Doutor Jose de la Fuente por ter cedido material indispensável a este trabalho, por ter possibilitado a minha estadia no IREC, pelos seus incentivos, sugestões e correções realizadas ao longo de todo o trabalho.

Ao Prof. Doutor Paulo Almeida pela excelente coordenação deste mestrado.

Agradeço a todo o grupo de trabalho. À Ana Custódio por todo o apoio prestado, pela paciência que teve comigo e pela ajuda na realização de todo o trabalho prático. À Luisa Simões pelas sugestões, preocupação e pela sua disponibilidade para me auxiliar sempre que necessário. À Lara Borges e Sandra Antunes pelos ensinamentos transmitidos e pelo apoio na realização do trabalho. À Ana Catarina Alves pela produção dos mosquitos e por me disponibilizar os mesmos, só assim foi possível a realização do trabalho. Um sincero obrigado a todas.

A todos as amigas que fiz nestes dois anos no IHMT, pela ajuda na realização de trabalho e/ou por todos os momentos divertidos que me proporcionaram e pela “família” que formamos nesta casa. Sem vocês estes dois anos não seriam a mesma coisa, foram vocês que tornaram este trabalho mais fácil. Agradeço especialmente, ao “Sr. Presidente” Renato Fernandes por todas as “situações divertidas” e pela colaboração na realização deste trabalho; ao “Sr.” Gonçalo Seixas pelos almoços divertidos; à Leonor Pinho pelos bons momentos que proporcionou e pelas “tareias” que me deu; à Fábica Gomes, apesar de termos convivido pouco tempo neste Instituto, ficou uma amizade, obrigado pelas brincadeiras e pela estadia em Madrid; à Marta Machado pela sua “antipatia e má

disposição”, tenho de admitir que sem esse mau feitio os tempos passados no laboratório não seriam tão bons.

Aos meus colegas e amigos de Mestrado, pelas pessoas que foram e pelos momentos que vivemos juntos, que jamais serão esquecidos. Fomos como uma família nestes dois anos, para o bom e para o mal! Agradeço por me terem aturado e pela vossa paciência. Obrigado Ana Sousa, Ana Filipa Teixeira, Isa Pires, Idalécia Moiane, Arlete Troco, Lis Coelho (*Docinho de Geleia*), Mónica Guerra e Miguel Landum. Tenho que saudar em especial um membro desta família, não só pela ENORME pessoa e AMIGO que é, mas por todo o apoio nos “altos e baixos” que passamos juntos, o Vasco Gordicho. Só por ter conhecido a tua pessoa já valeu a pena ter feito este mestrado, obrigado!

Muchisimas gracias às pessoas que me “acolheram” e ajudaram durante a estadia em Ciudad Real, e que tornaram esses tempos inesquecíveis, pelos *botellóns*, *ceñas internacionais* e *la familia ONU*. Um agradecimento especial ao Juan Moreno-Cid, pela sua amizade e pelos grandes momentos que passamos juntos. *Hasta luego* amigos.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração proporcionados, especialmente ao Pedro, Fábio, Tiaguinho e Nuno.

Teço os meus mais sinceros agradecimentos às duas pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais. Por me apoiarem em todas as minhas decisões, por me proporcionarem objetivos de vida mais ambiciosos e por todos os esforços que têm feito para me ajudar a chegar até aqui. OBRIGADO!

O meu sincero agradecimento às “outras” duas pessoas (não menos) importantes na minha vida, por me terem ajudado no que podiam e mesmo no que não podiam, os meus segundos pais. Quero agradecer especialmente ao meu avô, por ter iniciado esta etapa da minha vida ao meu lado e que infelizmente não a pôde terminar da mesma forma. Sei que acompanhas de outra forma. Obrigado por tudo aos dois.

À Cátia, mais que uma namorada, és a pessoa que está sempre ao meu lado, que atura o meu péssimo mau feitio quando as coisas correm mal (não sei como!), e que me apoia e critica em todas as minhas decisões. Obrigado por tudo, és essencial!

RESUMO

Estudos do Efeito da Proteína Recombinante Akirin na Infecção com *Plasmodium berghei* em *Anopheles gambiae* s.s.

Mário João Amaro da Costa

A malária é considerada uma das doenças mais importantes transmitida pelos mosquitos, tendo um grande impacto nos países não desenvolvidos. O controlo da malária continua fortemente dependente do uso de fármacos e estratégias para controlo do vetor. Como muitos compostos anti-maláricos já não são eficazes, novas estratégias de controlo são urgentemente necessárias, especialmente devido também ao facto de existirem poucos fármacos disponíveis e não existirem vacinas aprovadas. As proteínas akirin constituem um grupo recentemente renomeado de proteínas conservadas em insetos e vertebrados. O gene *akirin* atua em paralelo com o fator de transcrição NF- κ B, a jusante na via Imd, tendo uma forte atividade anti-plasmódio. O ortólogo da akirin nas carraças, subolesin, tem-se revelado como um antígeno protetor contra carraças em *Ixodes scapularis*. Estudos recentes mostraram uma redução na sobrevivência e/ou fertilidade destes vetores, após a alimentação em hospedeiros imunizados com os antígenos akirin e subolesin.

Nos nossos ensaios, foi realizado o silenciamento do gene *akirin* por RNAi em *Anopheles gambiae* s.s.. Os resultados obtidos mostram uma diminuição na produção de ovos de 39%, um aumento da intensidade de infecção de 35% e uma diminuição da sobrevivência de 17%.

Estes resultados fortalecem dados anteriores relativos à importância do gene *akirin* no sistema imune, sugerindo também o seu papel na reprodução. Os nossos dados reforçam a hipótese de que a akirin pode constituir um potencial antígeno protetor para o controlo do mosquito.

Experiências sobre a alimentação natural de *An. gambiae* s.s. em murganços imunizados com akirin foram realizados em paralelo mas os resultados obtidos não mostraram proteção contra a infecção por *Plasmodium* sp..

PALAVRAS-CHAVE: *Anopheles gambiae*, *Plasmodium*, akirin, antígeno protetor silenciamento, malária

ABSTRACT

Studys of the Effect of the Recombinant Protein Akirin on the infection with *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae s.s.*

Mário João Amaro da Costa

Malaria is considered one of the most important diseases transmitted by mosquito, having a great impact on underdeveloped countries. Malaria control is still heavily dependent of the use of drugs and vector control strategies. As many anti-malarial compounds are no longer effective, new control approaches are urgently needed, especially due too the fact that are few drugs available and no approved vaccines. Akirins constitute a recently renamed group of evolutionarily conserved proteins in insects and vertebrates. The gene *akirin* acts in parallel with the NF-κB transcription factor downstream of the Imd pathway having a potent anti-*Plasmodium* activity. Subolesin, the ortholog of akirin in ticks, was revealed as a tick protective antigen in *Ixodes scapularis*. Recent studies showed a reduction in the survival and/or fertility of these vectors after feeding in hosts immunized with subolesin and akirin antigens.

In our experiments, *akirin* gene knockdown by RNAi in *Anopheles gambiae s.s.* were carried on. Results obtained showed a decrease in eggs production of 39%, an increased infection intensity of 35% and a decrease on survival of 17%.

Together, these results strengthen previous data concerning the importance of *akirin* gene in the immunity system, suggesting as well its role on the reproduction. Our data reinforce that akirin may constitute a potential protective antigen for the control of mosquito.

Experiments regarding *An.gambiae s.s.* mosquitoes natural feeding on mice immunized with akirin were as well developed but the results obtained didn't show any protection against *Plasmodium* sp. infection.

KEYWORDS: *Anopheles gambiae*, *Plasmodium*, akirin, protective antigen, knockdown; malaria

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MALÁRIA.....	4
1.1.1 Parasita.....	4
1.1.1.1 Classificação sistemática do parasita.....	4
1.1.1.2 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.	5
1.1.2 Vetor	7
1.1.2.1 Classificação sistemática do género <i>Anopheles</i>	7
1.1.2.2 Bioecologia.....	7
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS	8
1.2.1 Parasita – <i>Plasmodium berghei</i>	9
1.2.2 Vetor	9
1.3 VACINAS	10
1.3.1 Vacinas anti- esporozoítos (Pré-eritrocitárias).....	11
1.3.2 Vacinas baseadas nas formas sanguíneas assexuadas do parasita	12
1.3.3 Vacinas baseadas nos gametócitos do parasita (Vacinas de Bloqueio de Transmissão – TBV).....	12
1.3.4 Vacinas baseadas em plasmídeos de DNA ou organismos vivos recombinantes.....	13
1.3.5 Vacinas anti-vetoriais	14
1.4 INTERAÇÃO PARASITA – VETOR.....	16
1.4.1 Sistema imunológico dos insetos.....	16
1.4.1.1 O sistema imunológico do mosquito	18
1.4.2 Função da Akirin	22
1.4.2.1 Nos mamíferos.....	24
1.4.2.2 Outras características e funções do gene <i>akirin</i>	26
1.4.2.3 Gene <i>subolesin</i> , o ortólogo do gene <i>akirin</i>	29
1.4.2.4 Reatividade cruzada entre Akirin e Subolesin.....	32
1.5 OBJETIVOS DO TRABALHO.....	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35

2.1	DECLARAÇÃO DE ÉTICA	36
2.2	MURGANHOS	36
2.3	PARASITA	36
2.4	MOSQUITOS	36
2.5	EFEITO DO SORO COM TÍTULO ELEVADO DE ANTICORPOS ANTI-AKIRIN	37
2.5.1	Desenho Experimental	37
2.5.2	Produção da proteína recombinante AKIRIN.....	38
2.5.3	Imunização dos Murganhos	38
2.5.4	Determinação do Título de Anticorpos - <i>Indirect Enzyme-Lynked Immonosorbent Assay</i> (ELISA indireta)	39
2.5.4.1	Título de anticorpos	40
2.6	ENSAIO DE SILENCIAMENTO DO GENE <i>akirin</i>	41
2.6.1	Produção de dsRNA.....	42
2.6.2	Silenciamento do gene <i>akirin</i>	43
2.6.3	Infeção dos mosquitos por <i>Plasmodium berghei</i>	43
2.6.4	Recolha de tecidos para confirmação do silenciamento, análise da intensidade de infeção e contagem de ovos por fêmea.....	44
2.6.5	Quantificação da expressão do gene <i>akirin</i>	44
2.6.6	Análise da quantidade da proteína akirin por Eletroforese de proteínas em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
2.6.6.1	SDS-PAGE	45
2.7	CONTAGEM DO Nº DE OVOS, MORTALIDADE, TAXA E INTENSIDADE DE INFEÇÃO	45
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3.	RESULTADOS	47
3.1	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS ANTICORPOS ANTI-AKIRIN SOBRE MOSQUITOS <i>anopheles gambiae</i> s.s. infetados com <i>Plasmodium berghei</i>	48
3.1.1	Caracterização do efeito dos anticorpos anti-akirin em mosquitos alimentados em murganhos imunizados.....	48
3.1.2	Efeito dos anticorpos dos murganhos imunizados com <i>Anopheles gambiae</i> s.s. - Alimentação natural	48
3.1.2.1	Efeitos na infeção por <i>Plasmodium berghei</i>	49

3.1.2.2	Efeitos na oviposição e produção de ovos nas fêmeas <i>Anopheles gambiae</i> s.s.....	50
3.1.2.3	Efeitos dos anticorpos anti-akirin na sobrevivência dos mosquitos <i>Anopheles gambiae</i> s.s.	52
3.2	CARATERIZAÇÃO DO GENE <i>akirin</i>	53
3.2.1	Efeito do silenciamento em <i>Anopheles gambiae</i> s.s.	53
3.2.1.1	Quantificação do silenciamento por RT-qPCR	53
3.2.1.2	Comparação dos níveis de expressão de mRNA do gene <i>akirin</i>	54
3.2.1.3	Análise do silenciamento por densitometria das bandas do gel SDS-PAGE	55
3.2.1.4	Intensidade de infecção por oocistos de <i>P. berghei</i>	57
3.2.1.5	Na produção de ovos	60
3.2.1.6	Na sobrevivência	63
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ÍNDICE DE FIGURAS	82
	ÍNDICE DE TABELAS.....	85
	ANEXOS	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorvância

AKR - akirin

AMP – Antimicrobial Peptide (Péptido Antimicrobiano)

avTBI – *Antivector transmission-blocking immunity* (Imunidade de bloqueio de transmissão anti-vetorial)

ddH₂O – Água bidestelada

DGV – Direção-Geral de Veterinária

dNTPs - *Deoxyribonucleotide Triphosphate* (3'-desoxinucleósido-5'-trifosfato)

DNA – *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

dsRNA – *Double-stranded RNA* (RNA de cadeia dupla)

ELISA - *INDIRECT ENZYME-LYNKED IMMONOSORBENT ASSAY*

FAM - *6-carboxyfluorescein* (6-carboxifluoresceína)

Fig. – Figura

Imd – *Immune Deficiency*

Mín – mínimo

Máx – máximo

MW - *Mann-whitney*

mRNA –RNA mensageiro

N – Tamanho Amostral

Nf-kB – Fator Nuclear Kappa B

NLS – *Nuclear Localization Signal* (Sinal de Localização Nuclear)

OMS - Organização Mundial de Saúde

p– Valor de p (*p-value*)

PAMP - *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a Patogénios)

pb – Pares de bases

PBS – *Phosphate buffered saline* (Solução Salina Tamponada)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação de Polimerase em cadeia)

PGRP – *Peptidoglycan recognition proteins* (Proteínas Reconhecedoras de Peptideoglicanos)

Proteína CSP – proteína circunsporozoítica

PRR - *Pattern Recognition Receptor* (Recetores de Reconhecimento Padrão)

RISC - *RNA-induced silencing complex*

RNA - *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RNAi – *RNA interference* (RNA de interferência)

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR - *Reverse Transcription quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Dodecil Sulfato de Sódio – Electroforese em gel de Poliacrilamida)

siRNA – *Small interfering RNA*

sp. – Espécie

spp. – Espécies

SPSS - *software Statistical Package for the Social Sciences*

s.s. – *Sensu stricto*

TBV – *Transmission Blocking Vaccines* (Vacinas de Bloqueio de Transmissão)

TBS - *Tris Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada com Tris)

TLR – *Toll-like Receptor*

U - Unidade

1. INTRODUÇÃO

A malária, também designada paludismo, existe há milhares de anos, e, por ter sido, inicialmente, associada a miasmas dos pântanos, a origem da palavra provém da conjugação de “*mal*” e “*aria*” que significa “mau ar” (Cox, 2010). Com a descoberta da associação dos microrganismos às doenças infecciosas, surgiram algumas teorias que resultaram de inúmeras pesquisas sobre as várias doenças mortais que afetavam as populações nessa época, entre as quais, a malária. Os avanços dos estudos científicos sobre esta doença só se tornaram possíveis após a descoberta dos parasitas por Charles Laveran em 1880, uma descoberta sem precedentes uma vez que até à data nunca se tinha descoberto um protozoário que parasitava eritrócitos humanos.

Alguns anos mais tarde os mosquitos foram identificados como transmissores ou vetores da doença, inicialmente no estudo de malária das aves, causada por *Plasmodium relictum*, por Ronald Ross em 1897 e, posteriormente, em estudos de malária humana realizados pelos malariologistas italianos Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava (Cox, 2010).

A malária afeta atualmente cerca de 100 países, sobretudo da África subsaariana, Sudoeste Asiático e América Latina (OMS, 2011). Existem 5 espécies de parasitas do género *Plasmodium* que afetam o homem, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No entanto, a maioria das mortes e situações de morbilidade são causadas pela espécie do parasita *P. falciparum*, que provoca a forma mais grave da doença, estimando-se que seja responsável por 300 a 500 milhões de casos clínicos e, aproximadamente, 1 milhão de mortes todos os anos (Phillips, 2001; OMS, 2011).

Durante o século XIX foram tomadas várias medidas de âmbito social e ambiental para o controlo de muitas doenças, tais como, melhoramento das habitações, drenagem dos terrenos adjacentes às habitações, entre outras, que contribuíram significativamente para a redução da distribuição global da malária. Este desenvolvimento social coincidiu com um desenvolvimento económico desigual no século XX, que veio evidenciar ainda mais a diferença entre os países mais desenvolvidos e os países mais pobres. Durante a “Era da Erradicação”, há mais de meio século atrás, a malária foi eliminada ou eficientemente suprimida em algumas partes do mundo, particularmente na Europa e outras regiões subtropicais (Guerin *et al.*, 2002). Porém, em algumas áreas em que a monitorização deixou de ser realizada e a sustentabilidade dos projectos de controlo foi interrompida registou-se uma reversão e

casos de reemergência com dificuldades acrescidas. Estas dificuldades incluíram sobretudo a resistência por parte do vetor e do próprio parasita aos inseticidas e aos fármacos, respetivamente. A mortalidade resultante da resistência aos fármacos aumentou 4 a 8 vezes (Hay *et al.*, 2004).

A permanência da malária nos países tropicais e subtropicais deve-se em grande parte aos problemas socioeconómicos destes países, à falta de programas de controlo efetivos e adequados, para além da existência de climas chuvosos e temperaturas elevadas favoráveis ao vetor. Hoje, considera-se que o aquecimento global e outras alterações climáticas podem alterar o mapa de distribuição da malária por se criarem condições para a sua transmissão, onde a mesma estaria controlada (Girard *et al.*, 2007). As alterações em termos de ocorrência ou risco de malária também estão associadas ao desenvolvimento de muitos países que defendem a sua economia com por exemplo, criação de barragens, novos cursos de água, ou negativamente pelo desflorestamento para fins comerciais. O aumento da malária urbana acaba por ser um resultado do desenvolvimento não planeado em torno das grandes cidades, sobretudo em África e no sul da Ásia, sendo um dos maiores problemas do futuro próximo a denominada malária suburbana. Outros fatores, todavia com menos impacto, são as transfusões de sangue infetado e a partilha de agulhas (Girard *et al.*, 2007).

Em resumo, os países endémicos para a malária estão entre os mais pobres do mundo, sendo que 1/3 da população mundial vive nessas áreas e ocorrerão casos clínicos de malária em aproximadamente 10% da população mundial anualmente, com enormes consequências sociais e económicas (Guerin *et al.*, 2002). Em média, devido a esta doença, perde-se mais de 76% de anos de vida produtiva do que com as doenças oncológicas existentes nos países desenvolvidos e, mesmo assim, o financiamento para a pesquisa na área da oncologia é 10 a 50 vezes superior (Phillips, 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), entidade responsável por liderar e coordenar as ações sanitárias a nível mundial, elabora e divulga relatórios anuais sobre as doenças que afetam o mundo, e no *ranking* dos países mais pobres a malária surge em 5º lugar como a maior causa de morte. O último relatório divulgado (OMS, 2011) refere que em 2010, 3.3 mil milhões de pessoas estiveram em risco de contrair a doença, ocorreram aproximadamente 216 milhões de casos de malária e 655 mil mortes, entre estes casos 81% (174 milhões) dos casos de malária e 91% das mortes sucederam-se na

região africana, sendo que nos grupos mais afetados estão incluídas as crianças com idade inferior a 5 anos e as mulheres grávidas (OMS, 2011). É no continente africano que existem as regiões de maiores taxas de inoculação entomológicas e níveis de prevalência a nível global (Fig. 1.1), e como consequência, maiores índices de mortalidade e morbidade devido à malária (Sinka *et al.*, 2010).

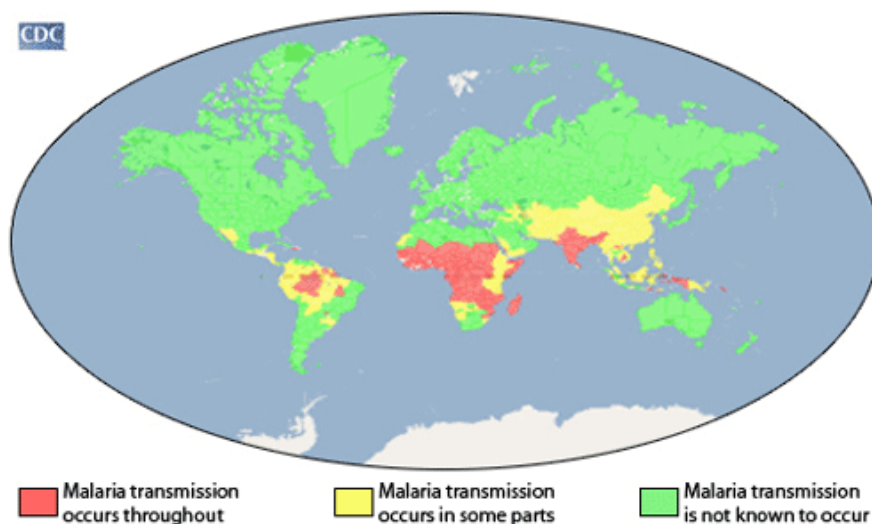


Fig. 1.1 Mapa representativo da distribuição da malária, a nível mundial. Geralmente ocorre em áreas onde as condições ambientais permitem a multiplicação do parasita no vetor. Porém a distribuição da malária é afetada por alterações climáticas, como o aquecimento global, e movimento de populações. Retirado de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm [Consultado 3 de Março de 2012]

1.1 MALÁRIA

1.1.1 Parasita

1.1.1.1 Classificação sistemática do parasita

De acordo com Ayala *et al.* (1998), as cinco espécies de parasitas que causam a malária são classificadas como:

Reino Protista

Filo Apicomplexa

Classe Hematozoa

Ordem Haemosporida

Família Plasmodiidae

Gênero *Plasmodium*

1.1.1.2 Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.

A espécie do parasita *P. falciparum* é responsável pela forma mais severa da doença, sendo predominante em África. A espécie *P. vivax* encontra-se mais distribuída pelas diferentes regiões do globo e é considerada menos perigosa que a primeira. As demais espécies que afetam o homem (*P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*) são encontradas menos frequentemente (Girard *et al.*, 2007).

Para além destas espécies, são conhecidas outras espécies de *Plasmodium* que afetam mamíferos, tais como *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. chabaudi*, que estão bem adaptadas aos seus hospedeiros selvagens, não parasitam humanos e são utilizadas como modelos experimentais em investigação.

A malária é transmitida aos humanos pela picada dos mosquitos *Anopheles* fêmeas infetadas que transmitem o parasita. Este, por sua vez, tem um ciclo de vida complexo com 2 fases (héptica e eritrocitária) tendo como hospedeiro definitivo o inseto e como hospedeiro intermediário, o homem (Tyagi *et al.*, 2012). O homem é o único reservatório para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, enquanto as espécies *P. malariae* e *P. knowlesi* podem parasitar outros primatas (Girard *et al.*, 2007).

O ciclo de vida das espécies de *Plasmodium*, que infetam humanos, inicia-se quando o mosquito fêmea durante uma refeição sanguínea transmite os esporozoítos (forma infetante para os humanos) (Fig. 1.2). Os esporozoítos através da circulação sanguínea invadem os hepatócitos, onde são submetidos a uma multiplicação assexuada (esquizogonia exo-eritrocitária) resultando na produção de uma grande quantidade de merozoítos. Estes merozoítos entram na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos, onde se desenvolvem (denominados aqui por anéis, trofozoítos e finalmente esquizontes, na sua fase multinucleada). Após rotura das hemácias parasitadas pelos esquizontes, quando maduros, libertam-se os merozoítos que invadem novas hemácias. Este processo pode ser repetido e é responsável pela doença e consequentemente, pelos sinais clínicos.

Entretanto alguns trofozoítos desenvolvem-se em gametócitos femininos e masculinos que podem ser ingeridos por um mosquito fêmea, numa refeição sanguínea, e desenvolver-se através do denominado ciclo esporogónico: dentro do lúmen do intestino médio do mosquito, ocorre a fusão dos gametócitos dando origem à formação de um ovo móvel ou oocineto que penetra na parede do intestino médio onde se irá

fixar, sendo aqui denominado por oocisto. No oocisto, o parasita multiplica-se formando milhares de esporozoítos. Estes irão migrar até às glândulas salivares onde permanecem e maturam, até uma nova refeição sanguínea onde serão inoculados no Homem (ou outro hospedeiro) e ocasionar uma nova infecção (Florens *et al.*, 2002; Girard *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2012).

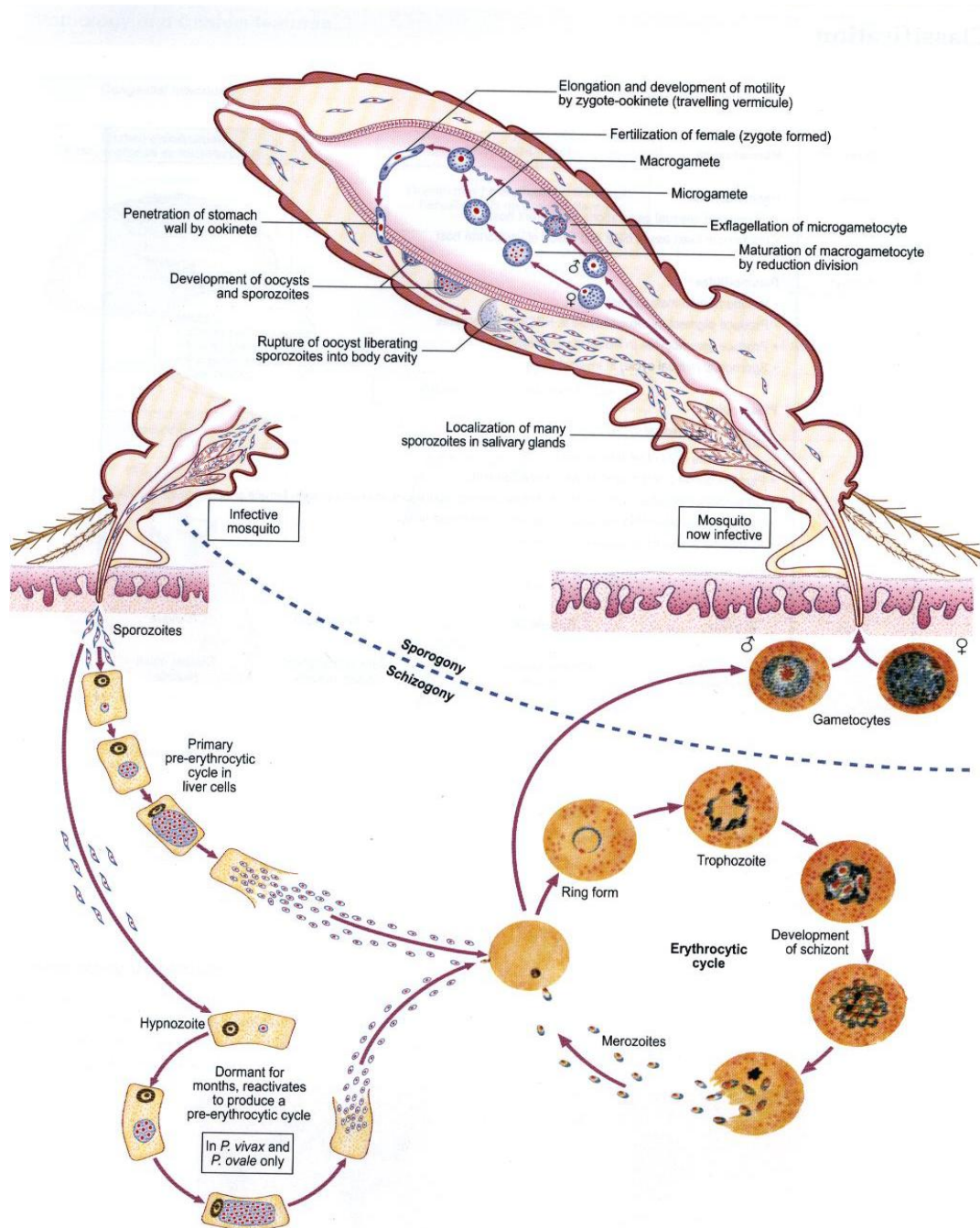


Fig. 1.2 Ciclo de vida do parasita *Plasmodium* spp. onde se representam dois hospedeiros o Homem e o mosquito. Retirado de Chiodini *et al.*, 2010

1.1.2 Vetor

1.1.2.1 Classificação sistemática do género *Anopheles*

De acordo com a classificação de Richard & Davies (1977), o género *Anopheles* tem a seguinte posição sistemática:

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Classe Insecta

Ordem Diptera

Família Culicidae

Género *Anophelinae*

1.1.2.2 Bioecologia

Os mosquitos do género *Anopheles* constituem economicamente e clinicamente os insetos mais importantes do mundo por serem vetores de diversas parasitoses, mas sobretudo por serem vetores extremamente eficientes da malária, altamente antropofílicos (mais de 95% das suas refeições são realizadas em humanos), realizam 2 a 3 refeições por cada ciclo gonotrófico (período específico da vida das fêmeas, que está dividido em três fases (i) procura por um hospedeiro apropriado e realização da refeição sanguínea; (ii) digestão e maturação dos ovos; (iii) procura por um local para realizar a oviposição e para o crescimento das larvas) e por poderem sobreviver mais do que um mês (Foy, 2002; Coetzee, 2004; Qiu *et al.*, 2011; Loaiza *et al.*, 2012).

Atualmente conhecem-se 465 espécies de *Anopheles* e mais de 50 membros sem nome pertencentes a este complexo de espécies. De todo este complexo, cerca de 70 espécies são capazes de transmitir o parasita da malária dependendo do local geográfico em que se encontram. Por exemplo, nas regiões mais fustigadas, como a região africana, os membros do complexo *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* são co-dominantes em grande parte do continente. O complexo *An. gambiae* contém as espécies vetorais mais eficientes para a malária de todo o mundo, destacando-se as espécies *An. gambiae s.s.* e *An. arabiensis* (Sinka *et al.*, 2012). Na região Ásia-Pacífico, a situação é muito mais complexa uma vez que coexistem várias espécies e a dominância das espécies é variável, como se pode verificar na figura 1.3. Neste complexo de espécies existem

algumas consideradas espécies crípticas que variam no seu comportamento e capacidade vetorial, apresentando assim dificuldades acrescidas para a gestão de programas de controlo (Coetzee *et al.*, 2000).

Todas as fêmeas pertencentes a estas espécies são anautógenas, isto é, necessitam de realizar refeições sanguíneas para produzirem os ovos e consequente continuidade do ciclo de vida e propagação da espécie (Hillyer, 2010).

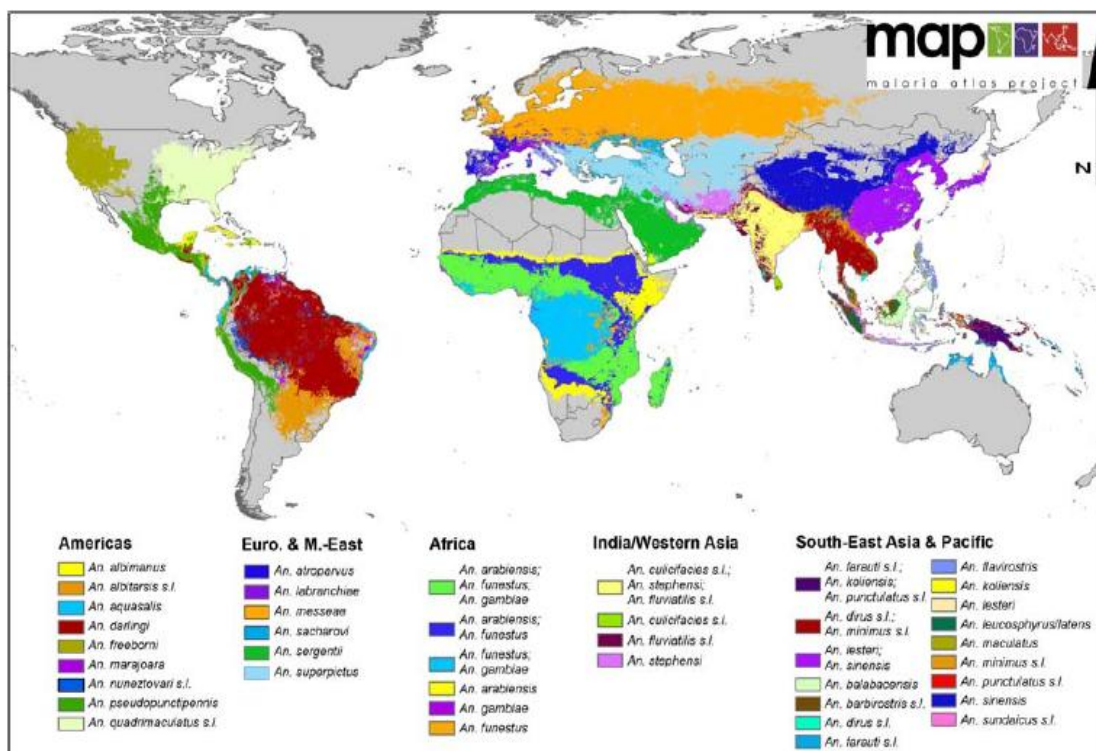


Fig. 1.3 Distribuição global dos principais vetores de malária. Retirado de Sinka *et al.*, 2012.

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

A investigação na área da malária apoia-se em modelos experimentais como os roedores ou primatas. Estes modelos têm sido uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de linhas de investigação relacionadas com a imunologia, patologia, teste de fármacos e desenvolvimento de vacinas.

A relevância da utilização de roedores como modelos experimentais em malária é controversa pois algumas das conclusões obtidas em certos estudos não são válidas para os humanos (Langhorne *et al.*, 2011), como são exemplo alguns marcadores moleculares indicadores de resistência a fármacos que são apenas observados em plasmódios de roedores. Contudo, os modelos animais continuam a ser a melhor base de

estudos prolongados e em metodologias onde não existam fatores internos (como por exemplo outras infeções, outros plasmódios, *background* genético do hospedeiro) ou externos (ambiente de biotério conservado e controlado), como é o caso da malária humana.

Os modelos *in vitro* são também uma opção para identificar interações moleculares entre o parasita e o hospedeiro, mas apresentam restrições nomeadamente em estudos prolongados e estudos que visam interações de carácter imunitário. Outros modelos como por exemplo, primatas não humanos, são dispendiosos e inacessíveis para estudos como o aqui apresentado.

1.2.1 Parasita – *Plasmodium berghei*

A espécie *Plasmodium berghei* é uma das espécies que infeta roedores murinos. O interesse neste modelo de roedores deve-se ao facto de ser prático para o estudo experimental da malária, uma vez que é análoga em aspetos estruturais, fisiológicos e do ciclo de vida, à malária humana. Os principais motivos que levam este modelo a ser utilizado nestes tipos de estudos são:

- Produção e cultivo de curta duração e purificação das diferentes fases do ciclo de vida do parasita *in vitro*;
- Genoma sequenciado;
- Disponibilidade de metodologias para modificação genética do parasita;
- Clones bem caracterizados e grande disponibilidade de linhas mutantes geneticamente modificadas, que incluem parasitas transgénicos que expressam genes tais como *Green Fluorescent Protein* (GFP) e *Luciferase*

(Leids Universitair Medisch Centrum, 2012)

Contudo, o ciclo de vida mostra um desenvolvimento não sincronizado dos diversos estádios de crescimento eritrocitários, ao contrário de *P. faciparum*.

1.2.2 Vetor

O único vetor conhecido para as espécies de *Plasmodium* que infetam roedores é a espécie *Anopheles durenii millescampsii*, o hospedeiro invertebrado de *P. berghei*. Algumas das espécies de *Anopheles* estabelecidas em laboratório como *Anopheles*

stephensi ou *An. gambiae s.s.*, são considerados bons transmissores de *P. berghei* e, por isso, são utilizados em investigação. O número de esporozoítos que invadem as glândulas salivares são relativamente baixos em *An. gambiae s.s.*, sugerindo que as condições de esporogonia neste hospedeiro não são, no entanto, as ideais.

De acordo com alguns autores, o mosquito *An. gambiae s.s.* representado na figura 1.4, não parece ser o vetor natural de nenhuma espécie de *Plasmodium* de roedores. A intensidade de infecção provocada por *P. berghei* ou *P. falciparum* no epitélio do intestino médio do mosquito, o número de oocistos ou mesmo de esporozoítos nas glândulas salivares produz resultados contraditórios entre as duas espécies. (Sinden, *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006). Os mosquitos *An. gambiae s.s.* e *An. stephensi*, continuam no entanto, a ser largamente utilizados como se pode comprovar através de uma consulta sumária dos trabalhos publicados na área.



Fig. 1.4 Fêmeas de *Anopheles. Gambiae s.s.* : alimentação num hospedeiro.

Retirado de http://www.vetorbase.org/Image/organism_pictures/Anopheles%20gambiae/A.gamb_mali_852cc.jpg
[Consultado 16 de Março de 2012]

1.3 VACINAS

Com exceção de poucas doenças transmitidas por insetos, como a febre-amarela, não foram ainda desenvolvidas ou implementadas quaisquer vacinas eficientes contra patógenos transmitidos por vetores (de la Fuente *et al.*, 2011).

Com o aumento da resistência aos inseticidas e aos fármacos, a necessidade de desenvolver uma vacina para a malária é cada vez mais necessária e expectável existindo no momento várias vacinas em fase de ensaio clínico, como é exemplo a vacina RTS,S/AS01 que é a mais avançada até à data, e encontra-se em fase III de ensaios clínicos, no estudo da eficácia, segurança e imunogenicidade. Até ao momento apresenta-se como uma forte candidata pois pode induzir uma eficácia clínica entre 25% a 60% em indivíduos voluntários de diferentes países endémicos (Schwartz *et al.*,

2012), é dirigida contra a fase pré-eritrocitária e baseia-se numa construção da proteína circunsporozoítica (CSP) da estirpe 3D7 de *P. falciparum*, juntamente com o antígeno de superfície da hepatite B (Stoute *et al.*, 1998; Guerin *et al.*, 2002; Ballou *et al.*, 2004; Girard *et al.*, 2007).

Os ensaios clínicos realizados até agora têm demonstrado:

- 1) A imunização de voluntários humanos com esporozoítos atenuados conferiu 90% de proteção contra a infecção por estirpe laboratorial mediada por mosquitos infetados, devendo-se realçar que se utilizou o parasita integral na imunização (Guerin *et al.*, 2002);
- 2) Imunidade naturalmente adquirida contra o parasita, essencialmente construída durante as duas primeiras décadas de vida em pessoas que vivem em zonas endémicas, traduz-se numa diminuição do impacto da doença e parece estar relacionada com a estimulação contínua devido às reinfeções (Guerin *et al.*, 2002);
- 3) É possível produzir imunidade através da transferência de globulinas híper-ímmunes de adultos ímmunes para indivíduos *naive* voluntários;

As vacinas podem ter como alvo diferentes fases do ciclo de vida do parasita, cada uma com reportório antigénico distinto embora idealmente se desejaria uma vacina eficaz contra mais que uma fase de desenvolvimento do parasita.

Sumariamente, existem:

1.3.1 Vacinas anti- esporozoíto (Pré-eritrocitárias)

Estas vacinas têm como objetivo atingir os esporozoítos ou os hepatócitos infetados e assim impedir a libertação dos primeiros merozoítos. A imunização com esporozoítos pode produzir imunidade, seja com esporozoítos irradiados ou com o uso de parte dos antígenos do parasita (Guerin *et al.*, 2002). A existência de polimorfismos em regiões imunologicamente importantes dos epítomos e a baixa imunogenicidade dos mesmos (Girard *et al.*, 2007) têm dificultado a produção/obtenção deste tipo de vacina.

1.3.2 Vacinas baseadas nas formas sanguíneas assexuadas do parasita

A razão para o desenvolvimento de vacinas deste tipo baseia-se nas seguintes observações: (i) passagem de anticorpos maternos para o feto conferindo uma janela de proteção contra episódios clínicos de malária; (ii) após infecções repetidas de malária a maioria dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas adquire capacidade para controlar a replicação do parasita, para parasitêmias inferiores às que resultariam em casos clínicos; (iii) globulinas híper-ímmunes do soro de indivíduos cronicamente infectados podem eliminar parasitas circulantes de *P. falciparum* em indivíduos não-ímmunes infectados (Ballou *et al.*, 2004).

O alvo destas vacinas são os antígenos da superfície do parasita, quer os à superfície do merozoító (MSP) quer os à superfície da membrana das hemácias parasitadas (Ballou *et al.*, 2004). O objetivo teórico destas vacinas é simular o que ocorre em adultos nas áreas híper-endêmicas, isto é, desenvolver imunidade mediada por anticorpos devido à exposição repetida à infecção (Guerin *et al.*, 2002). Uma redução da carga parasitária irá diminuir ou suprimir os sintomas, sobretudo da malária grave, e levar a uma diminuição da mortalidade e morbidade.

1.3.3 Vacinas baseadas nos gametócitos do parasita (Vacinas de Bloqueio de Transmissão – TBV)

Este tipo de vacinas tem como objetivo evitar que os mosquitos que se alimentam em indivíduos infectados adquiram e, posteriormente, transmitam a infecção, através da atuação dos anticorpos contra os antígenos das fases sexuais do parasita (Schwartz *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2012). Este tipo de vacinação não tem como objetivo proteger diretamente o indivíduo vacinado mas sim contribuir para a proteção da comunidade (Ballou *et al.*, 2004). Estudos pré-clínicos demonstram que os antígenos baseados nestas formas do parasita são capazes de prevenir o desenvolvimento de esporozoítos infecciosos nas glândulas de *Anopheles*, sugerindo que pode ser uma boa arma contra a malária (Ballou *et al.*, 2004). O maior problema deste tipo de vacinação é que o indivíduo vacinado não está protegido mas poderá afetar a infecção de mosquitos e portanto proteger a comunidade indiretamente. Apesar de esta abordagem ser eficaz em modelos experimentais, parece ser limitada por apresentar baixa imunogenicidade (Guerin *et al.*, 2002).

1.3.4 Vacinas baseadas em plasmídeos de DNA ou organismos vivos recombinantes

Estas vacinas têm levantado bastante controvérsia devido ao perigo biológico que podem representar dado que não é possível controlar uma eventual interferência no genoma do indivíduo vacinado. Estas vacinas têm essencialmente como base antígenos de *P. falciparum* e nos primeiros ensaios clínicos realizados demonstraram ser seguras (Tyagi *et al.*, 2012). No entanto, a produção de anticorpos pelo indivíduo vacinado é baixa ou nula, não conferindo assim a proteção desejada contra os esporozoítos (Tyagi *et al.*, 2012). Existem também as vacinas que utilizam organismos recombinantes vivos atenuados. Como vetores utilizam-se as estirpes modificadas de *Vaccinia Ankara* (MVA) (Girard *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2012), uma forma modificada do vírus da vacina contra a varíola, e alguns outros tipos de vírus (Adenovírus, Sindbis vírus, vírus da febre amarela ou estirpe atenuada do vírus Influenza). Algumas destas vacinas foram testadas em combinações de forma a serem mais eficazes a estimular o sistema imunológico, utilizando formulações de DNA e vírus Fowlpox (FPV) recombinantes ou vacinas MVA que codificam para a proteína CSP dos esporozoítos de *P. falciparum*. Todavia, não produziram resultados consistentes na proteção contra os mesmos. Ambas as vacinas de MVA ou FPV recombinantes foram consideradas seguras e adequadas para serem aplicadas em ensaios de larga escala em crianças de África, uma vez que não promovem infeção (Tyagi *et al.*, 2012). Apesar de se ter observado que a administração de algumas destas vacinas em murganhos promoviam o aumento da imunidade humoral e celular, em humanos não se verificaram os mesmos resultados, igualmente eficazes e, mesmo após terem sido testadas várias vias de administração.

Resumidamente, o que tem complicado, verdadeiramente, o desenvolvimento de uma vacina eficaz é a capacidade que o plasmódio tem para se evadir à imunidade do hospedeiro e a sua complexidade antígenica aliada a um polimorfismo genético. Assim, os seus antígenos poderão estar diferenciados nas diversas fases de desenvolvimento nos dois hospedeiros (Schwartz *et al.*, 2012). Apesar de existirem alguns alvos moleculares bem caracterizados, que podem ser selecionados para vacinas contra o parasita, e alguns deles posteriormente acabarem mesmo por fazer parte de vacinas promissoras em modelos animais ou em testes paralelos *in vitro*, é necessário uma

bateria de ensaios clínicos para verificar a sua ação em humanos e muitos deles acabam por ter uma baixa eficiência.

Tendo em vista os insucessos que os candidatos de vacinas com base num único antígeno ou fase do ciclo de vida do parasita têm tido ao longo dos vários ensaios realizados, existe uma tendência para optar por vacinas multi-componentes, ou que tenham como objetivo atingir vários estádios do parasita. Nesta situação existe, no entanto, a desvantagem de diminuir a imunogenicidade dos vários antígenos que compõem a vacina, quando comparada com um único componente (Guerin *et al.*, 2002).

1.3.5 Vacinas anti-vetoriais

Em paralelo com as linhas de investigação que visam desenvolver vacinas antiparasitárias, existem abordagens diferentes, baseadas na imunização com antígenos do mosquito vetor. Estas vacinas são chamadas anti-vetoriais, e têm como principal objetivo a interrupção do ciclo de transmissão de agentes patogénicos pelos vetores, e consequentemente reduzir a população efetiva de vetores pela diminuição das suas capacidade reprodutiva e vetorial.

Existe pois uma distinção entre a imunidade anti-vetorial que afeta diretamente o mosquito (morte ou redução de capacidades fisiológicas) ou indiretamente quando atua sobre o desenvolvimento do parasita bloqueando a sua transmissão (imunidade de bloqueio de transmissão anti-vetorial - avTBI). Para a transmissão da malária, qualquer vacina avTBI deve atuar durante a invasão do oocineto no estomago ou do esporozoíto nas glândulas salivares enquanto uma vacina anti-vetorial tem a vantagem de poder atuar em qualquer momento (Foy, 2002), sendo apenas necessária a realização da refeição sanguínea num hospedeiro imunizado.

Estudos publicados comprovam que anticorpos ingeridos durante a refeição sanguínea têm a capacidade de eliminar vetores ou reduzir a sua fertilidade.

Os antígenos do vetor que são utilizados neste tipo de imunização são chamados de “antígenos ocultos” (*concealed antigens*), uma vez que estes não são naturalmente apresentados ao sistema imunológico do hospedeiro.

Este tipo de abordagem com vacinas anti-vetoriais apresenta muitas vantagens pelas seguintes razões:

1. Os vetores podem ingerir uma quantidade de sangue até 5 vezes superior ao seu peso corporal, pelo que a quantidade de anticorpos ingeridos, teoricamente, é proporcionalmente ao tamanho da refeição sanguínea (Foy, 2002);
2. Os parasitas que são transmitidos apenas entre dois hospedeiros facilitam o controlo através da imunização, ao invés das parasitoses que têm múltiplos hospedeiros reservatórios;
3. Uma vacina anti-vetorial pode reduzir, em paralelo, a transmissão de outros agentes patogénicos que partilhem o mesmo vetor;

Os mosquitos do complexo *An. gambiae* alimentam-se, em média, em 3 hospedeiros diferentes antes de serem capazes de transmitir os esporozoítos, na fase em que já são capazes de transmitir, os mesmos, alimentam-se entre 4 a 12 vezes (Foy, 2002). Desta forma a cobertura da vacina na população não necessita de ser muito elevada para matar o mosquito antes de ele conseguir transmitir o parasita, na figura 1.5 está representado um modelo de uma vacina contra o mosquito numa área endémica que pode representar um bom modelo para o caso do principal vetor da malária humana.

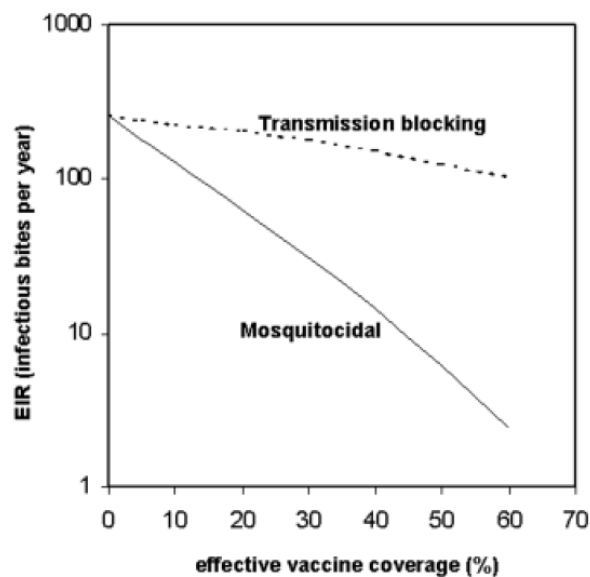


Fig. 1.5 Comparação entre o efeito previsto do uso de uma vacina contra o mosquito e uma vacina de bloqueio de transmissão no caso do vetor da malária numa vila na Tanzânia. Numa área altamente endémica com o aumento da percentagem da cobertura da vacina, a vacina contra mosquitos torna-se mais eficaz que a vacina avTBI. Retirado de Foy *et al.*, 2002.

1.4 INTERAÇÃO PARASITA – VETOR

Durante o ciclo de vida dos mosquitos fêmeas, ocorre necessariamente a alimentação sanguínea. Neste processo, os mosquitos ficam naturalmente expostos a diversos agentes patogénicos. É muitas vezes no interior dos mosquitos que se completa o desenvolvimento daqueles agentes ou, noutras situações, o mosquito é apenas um portador. Na malária, o mosquito vetor é fundamental no desenvolvimento do plasmódio, na produção de novos genótipos uma vez que é aqui que se dá a fertilização dos gametas e a recombinação genética.

A suscetibilidade à infeção varia com as espécies de mosquito; esta variação é resultado de um processo de co-evolução entre parasitas e vetores, sendo os exemplos mais evidentes o dos mosquitos do género *Aedes*, os únicos competentes para transmitir o vírus da Dengue, e o dos mosquitos do género *Culex* que transmitem o vírus da encefalite japonesa (Hillyer, 2010).

1.4.1 Sistema imunológico dos insetos

Grande parte do conhecimento sobre a imunidade dos organismos alcançado até aos dias de hoje deve-se sobretudo à disponibilidade de ferramentas genéticas cada vez mais sofisticadas e poderosas, mas também ao organismo modelo *Drosophila melanogaster* (Michel & Kafatos, 2005). Este organismo é o melhor modelo para estudos relacionados com a imunidade dado que o seu ciclo de vida é relativamente rápido e fácil de manipular em laboratório, o que torna a mosca da fruta numa ferramenta robusta (Christophides *et al.*, 2002); a estas vantagens acresce o facto de o seu genoma já ter sido sequenciado. Além deste organismo, também têm sido realizados estudos em mosquitos, como por exemplo *Aedes aegypti* e *An. gambiae*, que vieram a confirmar a importância e a semelhança de alguns mecanismos imunológicos previamente observados em *D. melanogaster* (Christophides *et al.*, 2002).

O sistema imunológico dos insetos tem duas grandes vias de transdução do sinal - Toll e Imd - que nos mosquitos levam à ativação de dois fatores de transcrição REL1 e REL2, respetivamente, que correspondem ao complexo proteico regulador da transcrição existente nos mamíferos, o fator nuclear kappa B, designado por NF-kB (Zou *et al.*, 2008).

Contrariamente às expectativas de alguns investigadores, as vias da resposta imune inata são bastante conservadas entre insetos e mamíferos, uma vez que a via Toll do sistema imunitário dos insetos tem equivalência com a via de sinalização Toll-like Receptor (TLR), nos mamíferos, enquanto a via da deficiência imune (Imd) é fortemente remanescente à via de sinalização TNF (Fator de Necrose Tumoral) dos mamíferos (Beutler, 2008; Schmidt *et al.*, 2008). Apesar destes seres vivos serem muito diferentes quanto à fisionomia, à fisiologia e aos mecanismos de defesa, apresentam semelhanças a nível do sistema imunológico, realçando assim a possibilidade de utilização de organismos invertebrados como modelos para estudar determinados mecanismos (Sutterwala & Flavell, 2008; Schmidt *et al.*, 2008; Hillyer, 2010).

O sistema imunológico possui três mecanismos principais de ataque aos parasitas: fagocitose, melanização e lise. Estes mecanismos são iniciados com o reconhecimento do parasita que desencadeia uma cascata de sinalização e subsequente ativação do mecanismo efetor. O tipo de resposta pode dividir-se em dois grandes grupos: inata celular e inata humoral (Fig. 1.6).

A resposta celular inclui fagocitose, encapsulação e melanização pelos hemócitos, enquanto a resposta humoral inclui a produção de péptidos antimicrobianos (AMP's), a produção de citocinas e também de compostos intermediários das espécies reativas de oxigénio e de azoto. As respostas imunológicas atuam coordenadamente, exemplo disso é a existência de componentes humorais que são produzidos pelos hemócitos e participam na resposta celular, na identificação de tecidos infetados e, em simultâneo, desencadeiam a melanização do agente patogénico e a cicatrização dos tecidos afetados pelos componentes celulares (Hillyer, 2010).

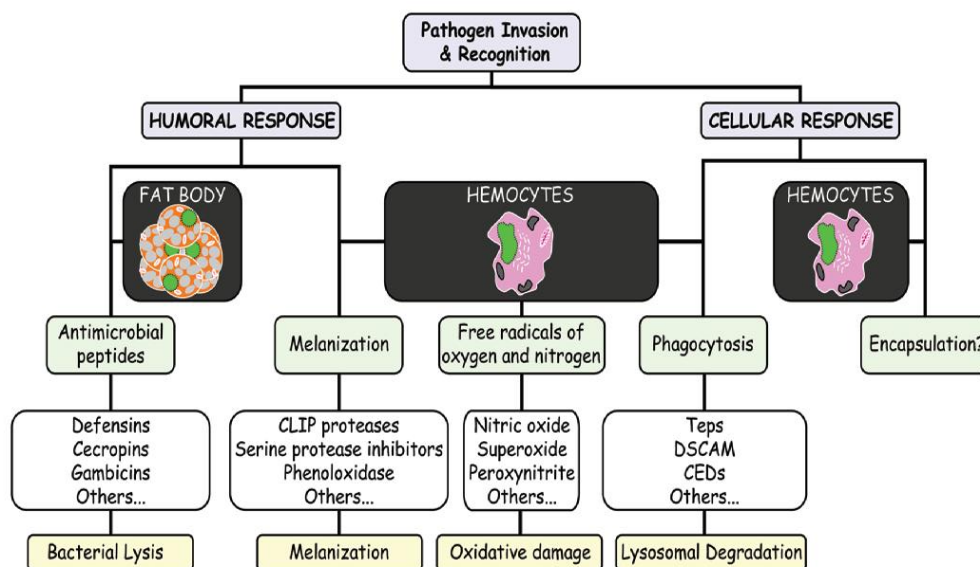


Fig. 1.6 Resposta imune no hemocélio do mosquito. A resposta antimicrobiana no hemocélio é medida pelos componentes do sistema imunitário aí existentes e também pelo corpo gordo. Esta resposta inclui a produção de péptidos antimicrobianos, melanização, espécies reativas de oxigénio, espécies reativas de azoto e fagocitose. Retirado de Hillyer (2010) .

1.4.1.1 O sistema imunológico do mosquito

Os agentes patogénicos adquiridos e transmitidos durante as refeições sanguíneas desenvolvem-se em três grandes compartimentos: o intestino médio, o hemocélio e as glândulas salivares. Para chegarem até estes compartimentos têm não só, que conseguir atravessar as barreiras fisiológicas e físicas, mas também evitar os obstáculos levantados pelos mecanismos imunológicos inatos do mosquito.

A primeira barreira que os parasitas têm de transpor quando são adquiridos na refeição sanguínea é uma barreira mecânica, a armadura cibarial, ou cibário que, no caso do protozoário *Plasmodium* spp. é facilmente ultrapassada, constituindo um problema apenas para os parasitas de maiores dimensões. Uma vez no lúmen do intestino, os parasitas deparam-se com as enzimas digestivas e a necessidade de transpor o epitélio do intestino médio, ocorrendo assim a maior redução da carga parasitária durante o desenvolvimento dos oocinetos no intestino médio, uma redução de 500 a 100 000 vezes no número de oocinetos. A segunda grande redução ocorre, após os oocinetos digerirem a matriz peritrófica e invadirem as células epiteliais, durante a transformação de oocineto em oocistos que ocorre na membrana basal do intestino médio, podendo verificar-se uma redução do número de parasitas viáveis de 5 a 100 vezes. Estas reduções estão associadas a um conjunto de fatores imunológicos que culminam com a

produção de péptidos antimicrobianos e ao processo de melanização que inibe essencialmente a continuação do desenvolvimento do parasita no intestino médio, impedindo-o assim de atingir os outros órgãos para completar o seu desenvolvimento.

O parasita para atingir os diversos órgãos do mosquito tem de migrar pelo hemocélio, que é uma cavidade aberta que contém todos os órgãos viscerais que estão delimitados por uma cutícula externa e pela membrana basal que envolve os tecidos internos. Ao circular nesse compartimento, o parasita encontra-se num meio rico em nutrientes mas encontra-se mais vulnerável ao sistema imunológico do mosquito, uma vez que é aqui que circulam as células responsáveis pela defesa, fatores de imunidade humoral produzidos pelos hemócitos e corpo gordo. Os hemócitos são as células vigilantes do sistema imunológico cuja função é a deteção de patógenos, sequestro e morte dos mesmos por fagocitose e secreção de fatores imunitários, (Figura 1.7). Os hemócitos circulam na hemolinfa ou tecidos viscerais e existem diferentes tipos, e o seu número diminui com a idade do mosquito. Os granulócitos que são uma forma de hemócitos, têm a capacidade fagocitar esporozoítos do plasmódio, porém a taxa de fagocitose desta forma do parasita é muito baixa quando comparado com outros agentes patogénicos como bactérias Gram negativas (Gram⁻).

Enquanto os hemócitos e, possivelmente, as células pericardiais intervêm nas respostas humoral e celular, o corpo gordo parece estar, exclusivamente, relacionado com a resposta humoral, através da produção de péptidos antimicrobianos e de espécies reativas de oxigénio e de azoto que são libertados na hemolinfa.

O corpo gordo é igualmente importante para a fisiologia e reprodução do mosquito, uma vez que é muito rico em glicogénio, lípidos, e porque sintetiza a vitologenina essencial para a produção de ovos (Hillyer, 2010).

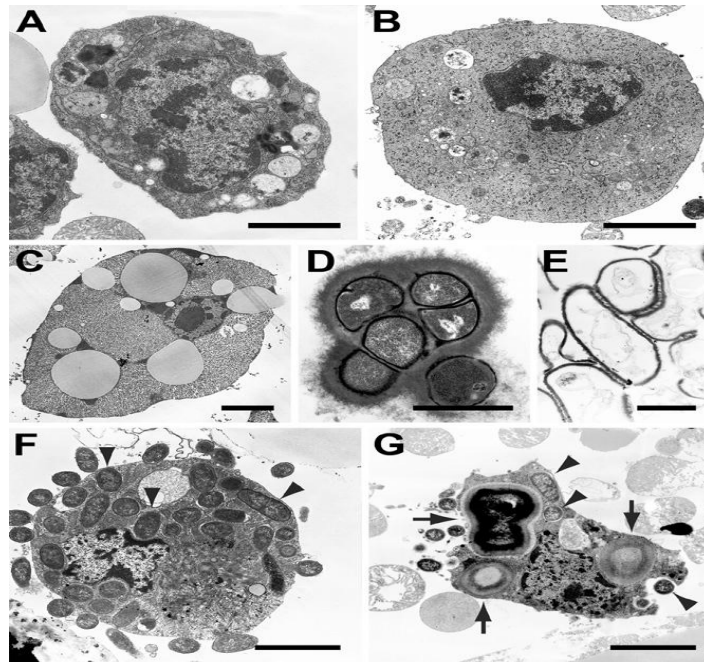


Fig. 1.7 Hemócitos e fatores da resposta imunológica no hemocélulo do mosquito, observação por microscopia eletrônica. A) Granulócito circulante; B) Oenocitóide circulante. C) Corpo gordo. D) Resposta imune através do processo melanização a *Staphylococcus aureus* no hemocélulo. E) Lise de *S. aureus* no hemocélulo. F) Fagocitose de *Escherichia coli* (representado pelas pontas das setas) e melanização de *Micrococcus luteus* (representado pelas setas) por um granulócito circulante. Retirado de Hillyer, 2010.

No que diz respeito à resposta humoral e celular mediada pelo conjunto de células e sinalizadores anteriormente referidos, a produção de AMP's e o processo de melanização são controlados pelas duas vias de transdução do sinal: Toll e Imd, que por sua vez ativam distintos fatores de transcrição do tipo NF-kB que levam expressão de genes específicos (Schmidt *et al.*, 2008). As reações humorais dos artrópodes podem ser divididas em 4 passos, apesar de *in vivo* todo estes processos se desenrolarem de forma encadeada e simultaneamente:

- a. Reconhecimento das moléculas do agente patogénico (padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs) e subsequente ativação da resposta imunológica inata através da ligação a recetores de reconhecimento de padrões (PRR's). Estes PRR's podem servir como opsoninas, facilitando a fagocitose, como recetores para as vias de transdução do sinal que levam à síntese de moléculas para combater a infeção por agentes patogénicos, como iniciadores da coagulação, da melanização ou outras cascatas de modificação de proteínas que são implicadas em diferentes fases da resposta imunológica. Um exemplo destas PAMPs são as proteínas que reconhecem peptidoglicanos (PGRPs); esta família distingue-se por possuir o domínio PGRP e tem diversas implicações na

ativação na resposta imunológica do inseto, incluindo a cascata de melanização, fagocitose e vias de transdução do sinal para a produção de efetores anti-Gram⁺ e anti-Gram⁻;

- b. Após ser detetada a infecção, iniciam-se as cascatas extracelulares de ativação das proteases serínicas e seus inibidores, se realmente existe perigo o sinal é amplificado caso contrário não é transmitido, a este processo chama-se modulação da resposta;
- c. Ativação de um conjunto diversificado de moléculas efetoras, entre estes péptidos anti-microbianos e a cascata de melanização;
- d. Reposição de moléculas relacionadas com o sistema imunológico através da ativação das vias de transdução do sinal como Toll e Imd, que levam à amplificação do sinal através da ativação transcricional de genes cruciais ao combate à infecção.

Relativamente a este último passo (d), a via Toll é estimulada pela invasão de bactérias Gram-positivas (Gram⁺), fungos, vírus e por parasitas como *Plasmodium* spp., e controla a produção de péptidos anti-microbianos através do fator de transcrição Rel1. A indução da via Toll pelo silenciamento do regulador negativo do fator de transcrição Rel1, o Cactus, diminui drasticamente a intensidade de infecção por *P. berghei* e *P. gallinaceum* no intestino médio dos mosquitos *Anopheles* spp. e *Aedes* spp., respetivamente. O co-silenciamento do Cactus e Rel1, resulta numa maior sensibilidade do mosquito à infecção.

A outra via Imd, está envolvida no combate à invasão de bactérias Gram⁻ e também de *Plasmodium* spp., e é controlada pelo fator de transcrição Rel2, cuja proteína reguladora negativa é a Caspar.

As duas vias estão envolvidas na resposta imunológica contra algumas espécies do parasita da malária, como é exemplo o *P. berghei*, no entanto, a resposta imunológica contra o parasita da malária humana é controlada primeiramente pela via Imd, sendo esta a mais influente no ataque aos parasitas. Têm sido realizados vários estudos que comprovam a importância desta via no combate ao plasmódio (Schmidt *et al.*, 2008; Hillyer, 2010; Garver *et al.*, 2012). Mais recentemente foi descrita uma terceira via, JAK-STAT, que parece ter maior importância nas infeções causadas pelos

vírus, podendo estar igualmente envolvida no controlo ao ataque aos parasitas *Plasmodium* spp. (Hillyer, 2010; Garver *et al.*, 2012).

1.4.2 Função da Akirin

Recentemente foi descoberto por Goto e colaboradores (2008), uma pequena família de proteínas estritamente nucleares altamente conservadas, inicialmente de funções desconhecidas e que *à posteriori* se vieram a revelar importantes na regulação da transcrição dos genes dependentes do complexo proteico NF-kB ou dos seus homólogos (Rel1 e Rel2). Estas proteínas são chamadas akirins proveniente da expressão japonesa ‘*akiraka ni suru*’, que significa ‘tornar as coisas claras’. Os insetos têm apenas um gene *akirin*, enquanto a maioria dos vertebrados apresentam dois genes homólogos *akirin1* e *akirin2* (Beutler, 2008; Goto *et al.*, 2008; Wan & Lenardo, 2010).

É reconhecido que a via Imd é a via mais importante no combate às infeções com as principais espécies de plasmódios. Apesar do mecanismo de deteção do parasita e subsequentemente início desta via ainda não estarem completamente esclarecidos, de uma forma genérica, sabe-se que a via Imd funciona da seguinte forma de acordo com os estudos realizados no modelo *Drosophila* e posteriormente verificados nos mosquitos: é iniciada quando ocorre a ligação das subunidades de peptidoglicanos às proteínas reconhecedoras de peptidoglicanos - PGRP-LC e PGRP-LE – ativando a proteína Imd, que é o elemento crítico do recetor que dá o nome à via. Estando esta proteína ativa, por sua vez recruta as proteínas Fadd e a caspase Dredd que vão levar à ativação do complexo de proteínas TAB2 e TAK1. Devido à atividade da cinase TAK1, ocorre a ativação de outras duas enzimas a IRD5 (que tem como homóloga nos mamíferos a IKK- β , que está envolvida na ativação do fator NF-kB) e a proteína Kenny (que tem como homóloga a IKK- γ , nos mamíferos); estas proteínas, por sua vez, adicionam um grupo fosfato ao complexo Relish (ortólogo do complexo NF-kB, nos mamíferos) que, ao ficar fosforilado sofre clivagem por acção de proteases, causando a translocação do fator de transcrição Rel para o núcleo, anteriormente retido no citoplasma das células não estimuladas. Uma vez no núcleo ocorre a transcrição dos genes alvo e a produção de péptidos antimicrobianos para combater a infecção. Para que aconteça a transcrição e produção de péptidos, é necessário a presença da akirin que funciona ao mesmo nível da Relish ou antes desta atuar, regulando assim atividade do

fator de transcrição Rel2 e também, de uma forma indirecta, a transcrição dos genes específicos regulados por este fator de transcrição, (Figura 1.8) (Christophides *et al.*, 2002; Michel & Kafatos, 2005; Sutterwala & Flavell, 2008; Beutler, 2008; Wan & Lenardo 2010).

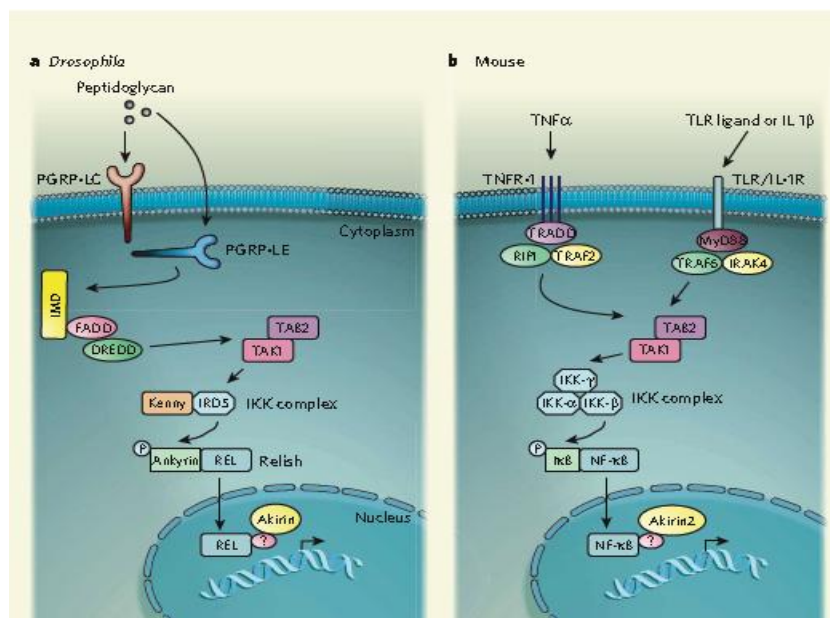


Fig. 1.8 Homologia do sistema imunitário entre os mamíferos e a maioria dos insetos. (A) Em *Drosophila* e outros insetos, a via Imd através de uma cascata de sinalização vai resultar no movimento do componente Rel (fator de transcrição como NF-κB) para o núcleo. Uma vez no núcleo este fator Rel vai mediar a transcrição de genes que codificam para péptidos anti-microbianos. (B) Nos mamíferos, a ativação do recetor TNF 1 (TNFR-1), do *Toll-Like Receptor* (TLR) ou do recetor Interleucina-1 (IL-1R) ativa a cascata de sinalização que resulta na passagem do fator de transcrição NF-κB do citoplasma para o núcleo e a ativação da transcrição de vários genes. A akirin de insetos é funcionalmente homóloga à akirin2 dos mamíferos, necessária para o fator de transcrição NF-κB. Retirado de Sutterwala *et al.*, 2008.

A presença desta proteína akirin no núcleo era inesperada uma vez que não apresenta nenhum domínio estrutural característico das moléculas de sinalização e a sua ausência não afeta a via Toll o que significa que está essencialmente envolvida na produção dos péptidos anti-microbianos e dos restantes genes envolvidos na imunidade que são controlados pela via Imd, isto é, tem uma função a jusante ou ao mesmo nível do fator de transcrição Rel (Goto *et al.*, 2008). A akirin pode interferir na expressão de alguns fatores do sistema imunológico que são eficientes no combate ao plasmódio, uma vez que são controlados pela via Imd através do fator de transcrição Rel2 (Garver *et al.*, 2012).

Foi demonstrado que moscas em que o gene *akirin* foi silenciado, são imunodeficientes e não sobrevivem a infeções por bactérias Gram⁻, confirmando mais uma vez a importância deste gene na via Imd. Aparentemente a akirin poderá ter outras

funções além do seu envolvimento na resposta imune uma vez que foi demonstrado que moscas *Rel*^{-/-} (relish deficientes) são viáveis e *Akirin*^{-/-} não o são, o que leva a sugerir que têm um papel crucial no desenvolvimento embrionário da *Drosophila* sp. e dos restantes dípteros (Goto *et al.*, 2008).

1.4.2.1 Nos mamíferos

Apesar da quantidade de informação existente sobre a “máquina molecular” NF- κ B, ainda existem muitas dúvidas para esclarecer. São as interação de outras proteínas existentes no núcleo com este complexo que determinam a especificidade e ativação de diferentes genes alvo, culminando na ligação do NF- κ B presente no núcleo ao DNA (Sutterwala & Flavell, 2008; Wan & Lenardo 2010).

Inicialmente, o complexo NF- κ B está retido no citoplasma das células não estimuladas, ligado a um membro da família das proteínas inibidoras IKK, mais precisamente ligado ao I κ B, que mascara a localização nuclear da sequência das proteínas Rel associadas. O complexo de cinase (IKK) ao ser ativado induz a fosforilação e subsequente degradação do inibidor I κ B, resultando na libertação do complexo proteico NF- κ B e na sua translocação para o núcleo onde se vai acumular e, ao ser estimulado por um mecanismo de sinalização, vai atuar como fator de transcrição pela sua ligação a sequências de DNA, conhecidas como locais κ B. Nestes locais, apesar da presença de homodímeros ou heterodímeros da família Rel (Wan & Lenardo, 2010), esta ligação parece ser insuficiente para a completa indução dos genes alvo, permanecendo assim por esclarecer de que modo o complexo NF- κ B selecciona especificamente os locais de ligação.

Como acima referido, uma das suas funções da proteína akirin consiste na modulação da atividade do fator NF- κ B quando este atinge o núcleo, mas não se sabe concretamente como interferem na função do fator NF- κ B e a forma como interagem, confirmando a sua sofisticada regulação (Figura 1.9) (Wan & Lenardo 2010).

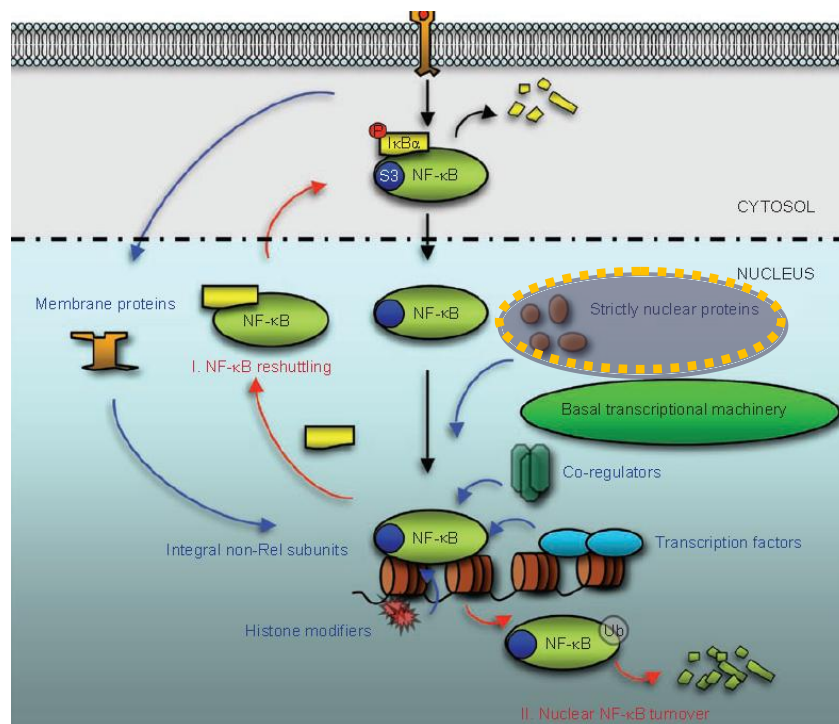


Fig. 1.9 Regulação nuclear do fator NF-κB. O fator de transcrição NF-κB após ganhar acesso ao núcleo, a atividade é altamente controlada por muitos reguladores nucleares, como está representado pelas setas azuis. A proteína akirin está incluída no grupo de proteínas estritamente nucleares que regulam este factor de transcrição. Estão também representadas duas vias distintas, com setas vermelhas, que esquematizam o que acontece ao NF-κB após completar a sua função (I) restituição do NF-κB para o citoplasma (II) degradação nuclear do complexo NF-κB, através da sua ubiquitinação. Adaptado de Wan *et al.*, 2010.

Nos murganhos, *Mus musculus*, foram encontrados 2 parálogos do gene *akirin* no cromossoma 4, mas distanciados um do outro. Um, é o gene denominado por *akirin1* que não é essencial no murganho, pois células deficientes para este gene (*MmAkirin1*^{-/-}) não têm um fenótipo distinto, nem são imunologicamente diferentes (Goto *et al.*, 2008).

Em contraste, o gene *akirin2* que é o que mais se assemelha em termos de funções ao único gene *akirin* dos insetos, é necessário para o desenvolvimento no murganho, uma vez que os homozigóticos *knockdown* (*MmAkirin2*^{-/-}) não sobrevivem na fase embrionária e, quando se interfere na função do gene em indivíduos adultos, estes são deficientes na função de certos genes alvo, regulados pelo complexo NF-κB quando estimulados por algumas moléculas do sistema imunitários, como os ligandos *Toll-Like-Receptors*, o TNF ou pela Interleucina - 1β (IL-1β) (Beutler, 2008; Sutterwala & Flavell, 2008; Wan & Lenardo, 2010).

A explicação mais viável sobre a função deste gene *akirin2* é que tem uma papel essencial na regulação a jusante do fator NF-κB, isto é, a proteína akirin deve ligar-se a uma proteína intermediária que por sua vez interage com o fator NF-κB e,

consequentemente, esta ação afeta a interação com a cromatina ou com componentes da maquinaria transcricional, uma vez que as proteínas akirin não parecem ligar-se ao DNA, pois não possuem nenhum motivo de ligação ao DNA ou RNA (Wan & Lenardo 2010) .

1.4.2.2 Outras características e funções do gene *akirin*

Estas proteínas são, como já referido, exclusivamente nucleares exibindo uma sequência que consiste num sinal de localização nuclear (NLS) entre os aminoácidos 24 e 29, do domínio N-terminal da proteína. A sua localização foi estudada por Goto e colaboradores (2008) com recurso ao vetor *V5* o qual foi transformado com a sequência do gene *akirin* de *D. melanogaster* (*DmAkirin*). Através da análise por *immunoblot* com anticorpo *anti-V5* foi demonstrado que a proteína akirin tem somente localização nuclear, e que esta localização está dependente da presença da NLS, na região N-terminal. Se ocorrer clivagem desta sequência, a proteína deixa de estar exclusivamente no núcleo (1.10a). Foi realizado um ensaio idêntico com os genes *akirin1* e *akirin2* de células humanas (*HsAkirin1* e *HsAkirin2*), com recurso ao vetor *Flag* e à linha celular *HeLa*, e os resultados foram semelhantes aos anteriormente descritos (Figura 1.10b) (Goto *et al.*, 2008).

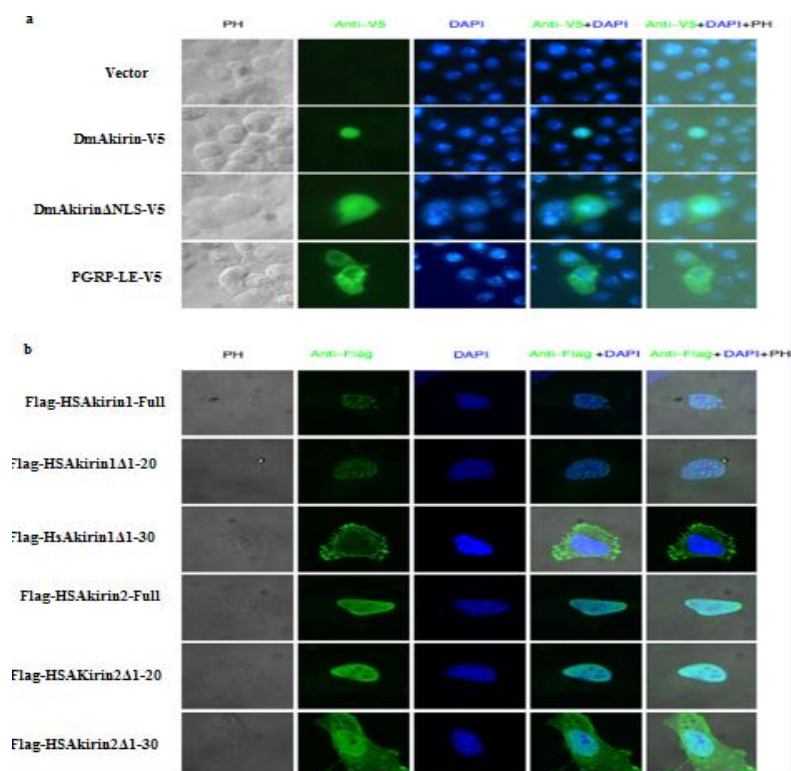


Fig. 1.10 Localização Nuclear da proteína Akirin. (A) Células S2 de *Drosophila* foram transfectadas com vetores V5 marcados com diferentes sequências, um com a sequência *DmAkirin*, outro com a sequência *DmAkirin* mas com os nucleótidos correspondentes ao sinal de localização nuclear (NLS) deletados, e outro com a sequência PGRP-LE, que serviu como controle negativo, uma vez que é uma proteína recetora que existe exclusivamente no citoplasma. As células foram coradas com DAPI (azul) para visualização do núcleo. Os diferentes vetores foram revelados com um anticorpo anti-V5 (verde). Os diferentes campos da célula foram visualizados em contraste de fase (PH). (B) Células Hela foram transfectadas com os vetores Flag com as sequências completas de *HsAkirin1* e *HsAkirin2*, e também sem as sequências NLS (do aminoácido 1 ao 20 ou do aminoácido 1 ao 30) de ambas as sequências. Retirado de Goto *et al.*, 2008.

O gene de *akirin* é conservado entre vários organismos, porém existem organismos que possuem 2 cópias homólogas, não totalmente iguais, com algumas diferenças entre si e consequentemente papéis diferentes no desenvolvimento e funções dos organismos. Nas plantas, leveduras e bactérias este gene(s) não existe(m). A homologia entre as sequências das proteínas resultantes deste gene *akirin* permitem separar os organismos em grupos, originando assim um grupo nos insetos e dois grupos nos vertebrados (Figura 1.11). A sequência da proteína de *akirin2* está mais relacionada com a sequência da *akirin* dos vertebrados, como já foi referido.

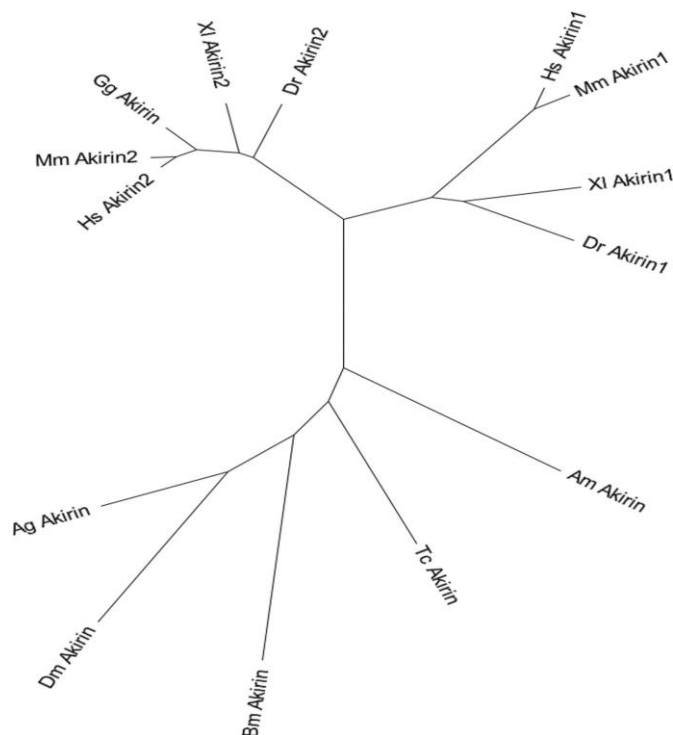


Fig. 1.11 Akirins são proteínas altamente conservadas. As sequências foram obtidas através da homologia com a proteína de *Drosophila melanogaster*, com recurso à ferramenta *Blast*. Nos vertebrados a Akirin está dividida em 2 grupos, Akirin1 e Akirin2; Akirin2 está mais relacionada com Akirin dos invertebrados. As sequências são as seguintes: Dm Akirin (Akirin de *Drosophila melanogaster*), Ag Akirin (Akirin de *Anopheles gambiae*), Bm Akirin (Akirin de *Bombyx mori*), Am Akirin (Akirin de *Apis mellifera*), Tc Akirin (Akirin de *Tribolium castaneum*), Gg Akirin (Akirin de *Gallus gallus*), Hs Akirin 1 (Akirin1 de *Homo sapiens*), Mm Akirin 1 (Akirin 1 de *Mus musculus*); Xl Akirin1 (Akirin1 de *Xenopus laevis*), Dr Akirin 1 (Akirin1 de *Danio rerio*), Hs Akirin2 (Akirin2 de *Homo sapiens*), Mm Akirin2 (Akirin2 de *Mus musculus*), Xl Akirin2 (Akirin2 de *Xenopus laevis*) e Dr Akirin2 (Akirin2 de *Danio rerio*). Retirado de Goto *et al.*, 2008.

O papel dos genes *akirin* nos dípteros e o gene *akirin2* nos vertebrados não se resume apenas ao sistema imunológico, isto é, a sua importância estende-se também ao desenvolvimento do organismo. Algumas das outras funções que o gene *akirin* parece desempenhar:

- Modulação da via de desenvolvimento *Wnt-Wingless* (Wg) em *Drosophila* e, possivelmente, noutros dípteros. Esta via é uma via de sinalização altamente conservada que regula vários aspetos do desenvolvimento, funções celulares dos metazoários e parece estar envolvida na resposta inflamatória. Deficiências na mesma parecem estar associadas a doenças em humanos (cancros, doença de Alzheimer) (Goto *et al.*, 2008; DasGupta, 2005);
- Interação com um dos fatores de transcrição GATA que é essencial para o desenvolvimento do tórax em *Drosophila* spp. e em outros dípteros (Goto *et al.*, 2008; Sutterwala & Flavell, 2008);

- Facilita a interação com o fator de transcrição *Twist* e a cromatina, interagindo com este fator física e geneticamente. Este fator de transcrição é altamente conservado regulando várias vias durante a embriogênese, bem como metástases dos cânceros. De igual modo, exerce uma função de regulação durante o desenvolvimento embrionário em *Drosophila* spp.. Ensaios realizados com *Drosophila* spp. que apresentavam diferentes mutações para o gene *akirin*, demonstraram a existência de fenótipos diferentes e deficientes relativamente à musculatura (Figura 1.12) (Nowak *et al.*, 2012).

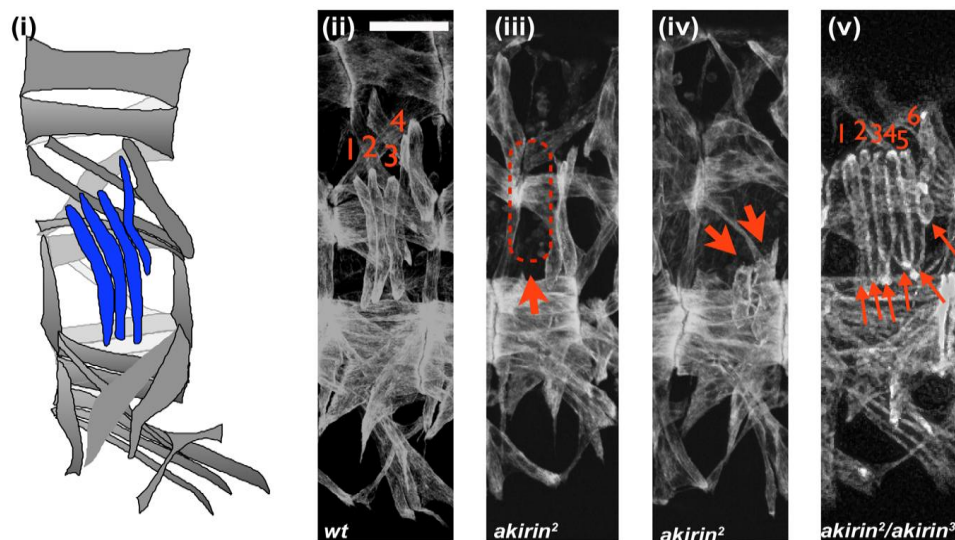


Fig. 1.12 Moscas mutantes para *akirin* exibem diferentes fenótipos musculares nos embriões. Vista lateral dos embriões, a parte dorsal está à direita nas imagens. As figuras i e ii ilustram embriões com fenótipo *Wild-Type*, iii e iv embriões com fenótipos resultantes de mutações no gene *akirin*. Utilizaram-se anticorpos anti-tropomiosina para se observar os diferentes fenótipos a nível da musculatura. As setas a vermelho demonstram os defeitos musculares predominantes, nas figuras (iii) observa-se a ausência de músculos, (iv) músculos indevidamente formados, (v) músculos duplicados. Retirado de Nowak *et al.*, 2012.

1.4.2.3 Gene *subolesin*, o ortólogo do gene *akirin*

Estudos realizados antes de ser conhecido o gene *akirin*, demonstraram a existência na carraça *Ixodes scapularis* do gene *subolesin*, semelhante aos genes *akirin* nos insetos e vertebrados. Quando esta nova proteína, *akirin*, foi descoberta não foi associada a sua função à *subolesin* existente nas carraças. Foi demonstrado que esta proteína nas carraças tem várias funções, tais como controlo de múltiplas vias celulares através da função reguladora na expressão global de alguns genes, modulação da alimentação e regulação da reprodução e desenvolvimento (Canales *et al.*, 2009). O

gene *subolesin* é conservado entre as diferentes espécies de carraças, bem como noutros invertebrados e outros organismos vertebrados. Através de análises filogenéticas, verifica-se que existe um elevado grau de conservação entre os genes *akirin* de insetos e vertebrados e o gene *subolesin* de carraças, confirmando a sua homologia (Galindo *et al.*, 2009).

Através de estudos funcionais realizados por Goto e colaboradores (2008) sugerem que a *akirin2* dos vertebrados é mais próxima da *akirin* dos invertebrados do que a *akirin1*. A análise filogenética realizada por Galindo *et al.*, (2009) demonstrou que o gene *subolesin* de carraças se encontra mais próximo do gene *akirin1* dos vertebrados do que do gene *akirin2* (Figura 1.13). Apesar desta diferença inferida através das árvores filogenéticas, os resultados de ensaios de silenciamento realizados durante o desenvolvimento dos embriões sugerem que *subolesin* das carraças e *akirin* dos artrópodes são funcionalmente homólogos ao gene *akirin2* e não ao gene *akirin1* (Goto *et al.*, 2008; Galindo *et al.*, 2009). Além do mais, apenas *akirin2* tem um papel crucial na resposta do sistema imune mediada pelo NF- κ B, enquanto *akirin1* continua a ter um papel desconhecido (Goto *et al.*, 2008; Galindo *et al.*, 2009).

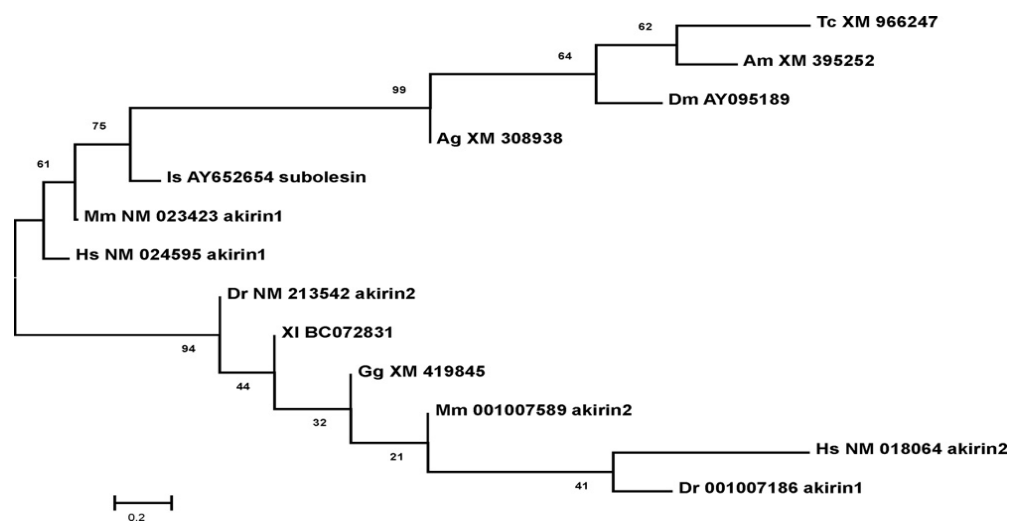


Fig. 1.13 Árvore filogenética que demonstra o alto grau de conservação entre o gene *subolesin* das carraças e o gene *akirin* dos insetos e vertebrados. A sequência do gene *subolesin* é mais próxima da sequência do gene *akirin1* dos vertebrados do que do gene *akirin2*. Dm: *Drosophila melanogaster*; Ag: *Anopheles gambiae*; Am: *Apis mellifera*; Tc: *Tribolium castaneum*; Gg: *Gallus gallus*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; XI: *Xenopus laevis*; Dr: *Danio rerio*; Is: *Ixodes scapularis*. Retirado de Galindo *et al.*, 2009

Resumindo, o gene *subolesin* das carraças é um ortólogo do gene *akirin* nos insetos e nos vertebrados, desta forma a função de ambos afeta a função de genes envolvidos na resposta imune e a expressão de alguns genes envolvidos no

desenvolvimento dos organismos, funcionando assim como reguladores positivos e negativos da transcrição. Estas funções dos genes *akirin* e *subolesin* como fatores de transcrição explicam o efeito profundo do silenciamento de ambos na fisiologia e expressão dos genes nas carraças, nos mosquitos, em *D. melanogaster* e em murganhos. O reconhecimento da *subolesin* como um órtologo da *akirin* nos artrópodes e vertebrados apoia a necessidade de mais investigação do papel destas proteínas na evolução da interação organismo patogénico – hospedeiro (Galindo *et al.*, 2009).

Foram realizados alguns estudos em carraças e, até ao momento, apenas dois estudos em mosquitos e flebótomos que demonstram a importância dos genes *subolesin* e *akirin*, nestes vetores. A base destes estudos foi a técnica molecular de RNA de interferência (RNAi) e imunização com os antígenos correspondentes a estes dois genes. Os ensaios de vacinação usando as duas proteínas recombinantes tiveram como objetivo imunizar os hospedeiros onde as carraças, mosquitos e flebótomos se alimentam, e assim medir os efeitos na sobrevivência, reprodução e, também o efeito na transmissão de parasitas dos quais estes artrópodes são vetores.

Alguns dos efeitos reportados em carraças como consequência da imunização dos hospedeiros contra a *subolesin* foram: diminuição da sobrevivência, redução da capacidade de reprodução e, em algumas espécies, degeneração de alguns tecidos e redução da infeção por alguns agentes patogénicos transmitidos por essas espécies de carraças, como por exemplo *Anaplasma phagocytophilum* (Canales *et al.*, 2009).

Na tabela 1.A estão sumarizados os resultados de todos os estudos realizados com estas duas proteínas em carraças e mosquitos.

Tabela 1.A Estudos preliminares realizados com Akirin e subolesin, com o objetivo de avaliar a sua capacidade como vacinas anti-vetores.

Artrópode	Tipo de ensaio	Resultados	Artigo
Carraças	Silenciamento do gene <i>subolesin</i> ; Alimentação em coelhos com a proteína recombinante subolesin	Inibição da postura de ovos;	Manzano-Román <i>et al.</i> , 2012
	Silenciamento de carraças com dsRNA Akirin de <i>A.albopictus</i>	Aumento da mortalidade; Diminuição do peso	Canales <i>et al.</i> , 2009
	Alimentação em coelhos imunizados com a proteína recombinante subolesin	Diminuição da oviposição	Manzano-Román <i>et al.</i> , 2011
Mosquitos (<i>A.albopictus</i>, <i>A.aegypti</i>) e Flebótomos (<i>P.perniciosus</i>)	Alimentação em murganhos imunizados com a proteína recombinante Akirin	Diminuição da fertilidade em <i>Ae.albopictus</i> e <i>P.pernicosus</i>	Moreno-Cid <i>et al.</i> , 2011
Mosquitos (<i>A.artroparvus</i>, <i>A.caspius</i> e <i>C.pipiens</i>) e Flebótomos (<i>P.perniciosus</i>)	Alimentação artificial com anticorpos anti-akirin de <i>Aedes albopictus</i> ;	Diminuição da sobrevivência; Diminuição do nº de larvas e do nº de adultos após eclosão	Canales <i>et al.</i> , 2009

1.4.2.4 Reatividade cruzada entre Akirin e Subolesin

A análise das sequências destas duas proteínas ortólogas revelou um alto grau de conservação entre mosquitos e carraças, sugerindo assim a presença de epítomos antigénicos conservados. Este pressuposto da existência de imunidade cruzada foi confirmado por *Western blot* e ELISA para as proteínas akirin e subolesin de *Aedes albopictus* e *Ixodes scapularis*, respetivamente. De acordo com o estudo publicado por Canales *et al.*, (2009), o desenvolvimento de uma vacina que abranja múltiplos artrópodes vetores pode ser possível usando ortólogos da subolesin. Apesar da informação já existente será necessário realizar mais estudos para confirmar a akirin como possível candidato antigénico protector; entre estes estudos destaca-se a necessidade de:

- Vacinar experimentalmente murganhos com antígenos recombinantes de subolesin e akirin para avaliar os efeitos nos mosquitos alimentados nestes hospedeiros;
- Avaliar a eficácia dos antígenos recombinantes contra outras espécies de artrópodes;
- Comparar a eficácia das proteínas recombinantes akirin de mosquitos e subolesin de carraças isoladamente ou através de combinações no controlo de infestações com mosquitos, flebótomos e carraças;
- Caracterizar as sequências destas proteínas noutros vetores de importância veterinária e de saúde pública e, consequentemente, a sua capacidade para induzirem proteção;

1.5 OBJETIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho representa um estudo que pretende avaliar a capacidade de protecção induzida pelo antigénio akirin (AKR) de *Anopheles gambiae* s.s. na infecção por *Plasmodium* spp., e sugerir a sua utilização como um candidato a integrar uma vacina que ajude ao controlo da malária. Assim, o plano de trabalho baseou-se em duas linhas essenciais:

- I. Caracterização do gene *akirin* de *Anopheles gambiae* s.s. durante o desenvolvimento do mosquito adulto e a infecção por *P. berghei*, através da análise da expressão e do silenciamento génico;
- II. Desenvolvimento de ensaios de vacinação com a proteína recombinante akirin em murganhos CD-1;
- III. Caracterização do efeito de anticorpos anti-akirin na infecção por *P. berghei* e desenvolvimento de *An. gambiae* s.s.;

Este trabalho permitirá avaliar o efeito do gene *akirin* na modulação da infecção do inseto vetor por plasmódios e, tem como hipótese principal avaliar o antigénio AKR como um candidato protetor para o controlo de insetos vetores e transmissão/infecção de patógenos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

A manutenção e tratamento dos animais utilizados neste trabalho, foram realizados em conformidade com as recomendações na Diretiva Europeia 86/609/EEC e lei Portuguesa, Decreto-Lei 129/92 para investigação biomédica envolvendo animais. Todos os detalhes deste estudo foram aprovados pela Divisão-Geral de Veterinária (DGV), Portugal, ao abrigo da Portaria 8 n° 1005/92 de 23 de Outubro. Todos os ensaios foram realizados sob anestesia e os procedimentos em geral, procuraram minimizar o sofrimento animal.

2.2 MURGANHOS

Os murganhos (*Mus musculus*) utilizados em todas as experiências foram obtidos no biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e tinham uma idade entre 4-6 semanas. Para a alimentação dos mosquitos nos ensaios de silenciamento foram utilizados murganhos CD-1. Nos ensaios de alimentação natural foram utilizados murganhos BALB/C.

A infeção dos mosquitos com *P. berghei* foi conseguida por alimentação direta em murganhos previamente infetados. Os murganhos foram inoculados intraperitonealmente com 10^7 eritrócitos parasitados com *P. berghei* e a parasitémia e a gametocitémia medidas diariamente, a partir de amostras de sangue retiradas da cauda e utilizadas para efetuar esfregaço sanguíneo. Posteriormente fixadas com metanol durante 30 s e, em seguida, coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, USA).

2.3 PARASITA

O parasita utilizado em todas as experiências que envolviam infeção de murganhos e de mosquitos, foi a estirpe *P.berghei* GFP CON. Esta estirpe é modificada geneticamente para expressar a proteína verde fluorescente (GFP) possibilitando assim, uma observação dos parasitas, mais fácil.

2.4 MOSQUITOS

Os mosquitos *An. gambiae* s.s. da estirpe de Yaoundé, forma molecular M, foram obtidos do insectário do IHMT, e utilizados com 2-3 dias de idade, com exceção

dos utilizados nos ensaios de alimentação natural e artificial que tinham 4-5 dias de idade. Os mosquitos foram criados dentro de gaiolas de náilon, a uma temperatura de 26°C e 75% de humidade num ciclo de 12/12 horas de luz/escuro, e receberam um suplemento de glucose de 10%.

A infecção dos mosquitos foi realizada quando para parasitémias entre 10 -20% e quando era observada exflagelação. Antes da alimentação, os murganhos foram anestesiados e colocados na superfície das gaiolas dos mosquitos durante 45 minutos, permitindo assim o acesso dos mosquitos aos murganhos (Fig.2.1). No final todos os mosquitos não alimentados foram excluídos das experiências.

As fêmeas engorgitadas foram mantidas a 19-21°C e a 80% de humidade para permitir o desenvolvimento do *P. berghei*. Dentro da gaiola foi colocado um recipiente húmido para a postura de ovos (apenas nos ensaios de alimentação natural).



Fig. 2.1 Murganhos anestesiados durante a alimentação de mosquitos.

2.5 EFEITO DO SORO COM TÍTULO ELEVADO DE ANTICORPOS ANTI-AKIRIN

2.5.1 Desenho Experimental

Inicialmente foram pensados realizar dois tipos de experiências, alimentação natural e artificial, para alimentar mosquitos *An. gambiae* s.s., contudo os ensaios de alimentação artificial não estão ainda concluídos, portanto só estão presentes neste

trabalho os resultados da alimentação natural. Os métodos foram idênticos para ambas as experiências e estão esquematizados na figura 2.2.

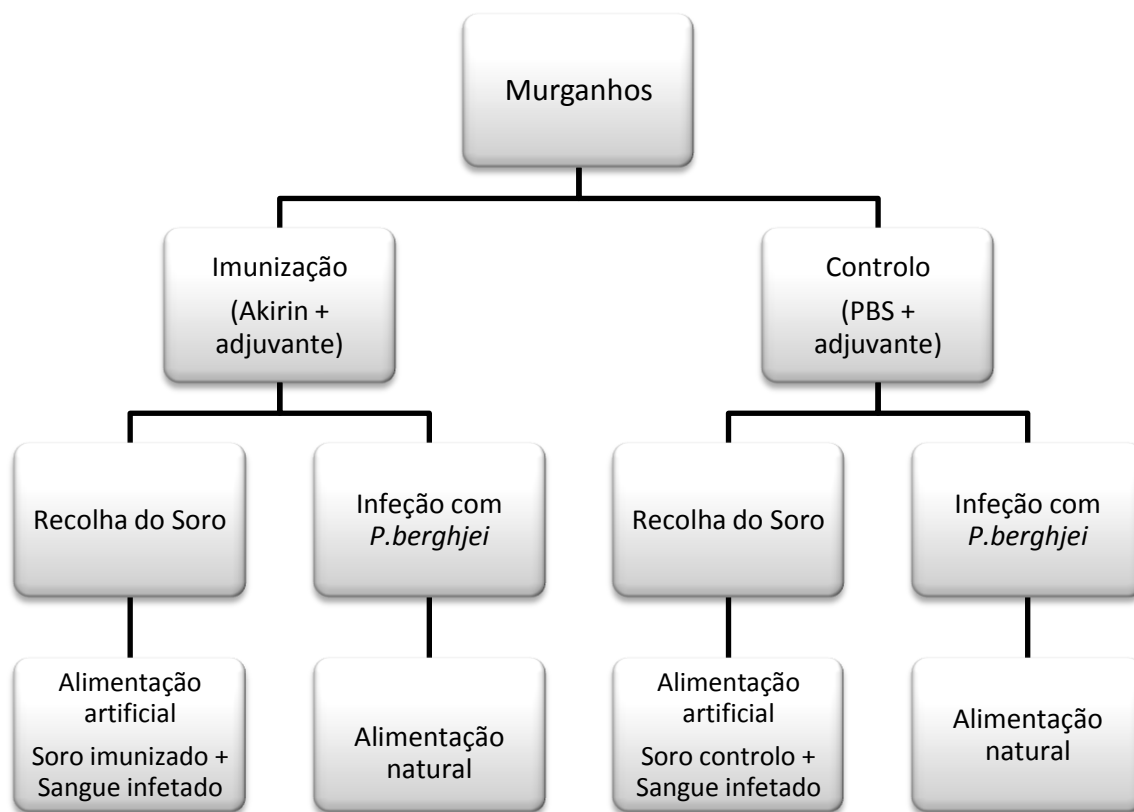


Fig. 2.2 Desenho experimental da alimentação natural e artificial, dos mosquitos *Anopheles gambiae* s.s. em murganhos BALB/C. Os ensaios de alimentação artificial não estão ainda concluídos.

2.5.2 Produção da proteína recombinante AKIRIN

A produção de vacinas com o antígeno akirin, produzidas a partir da proteína recombinante akirin de *Aedes albopictus*, foi realizada no *Institute de Investigación en Recursos Cinegéticos* (IREC) em Ciudad Real, Espanha. A proteína recombinante foi produzida de acordo com o descrito na bibliografia em Canales *et al.*, 2009, utilizando como sistema de expressão leveduras *Pichia pastoris*.

2.5.3 Imunização dos Murganhos

Com o objetivo de avaliar o efeito da akirin em mosquitos infetados com *Plasmodium* sp., imunizaram-se murganhos utilizados posteriormente para alimentação de mosquitos. Foram realizadas 4 imunizações intraperitoneais, com um intervalo de 3 semanas. Foram imunizados com doses de 100 uL de vacina contendo 50 ug do antígeno recombinante ou com tampão fosfato-salino (PBS) adjuvado com Montanide

ISA 50 V2 (Seppic, Paris, França) (fig.2.3). Duas semanas após a última imunização os murganhos foram utilizados na alimentação de mosquitos.

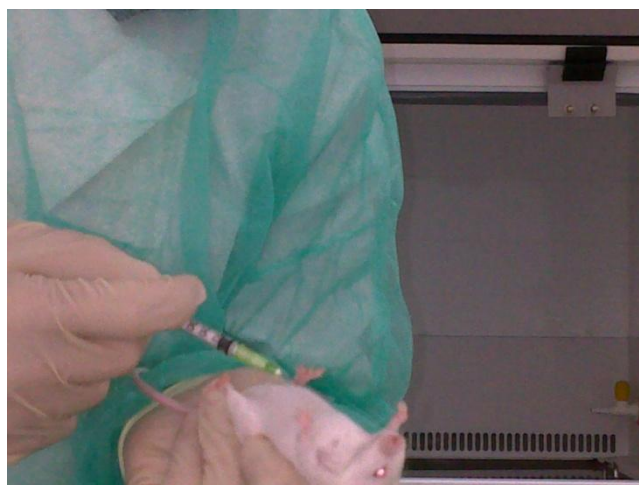


Fig.2.3 Imunização de murganhos. Inoculação intraperitoneal num murganho BALB/C

2.5.4 Determinação do Título de Anticorpos - *Indirect Enzyme-Linked Immonosorbent Assay* (ELISA indireta)

Os princípios desta técnica imunoenzimática baseiam-se na ligação específica entre o anticorpo primário que queremos testar e o antígeno. Após essa ligação é adicionado um anticorpo secundário conjugado a uma enzima, neste caso a fosfatase alcalina, que vai reconhecer e ligar-se ao anticorpo primário. Por último, adiciona-se o substrato que vai ser degradado pela enzima que está conjugada ao 2º anticorpo e dessa reação imunoenzimática resulta um produto de cor amarela, que é mais intenso quanto maior for o número de ligações entre o anticorpo e o antígeno. Todo este processo está resumido na figura 2.4.

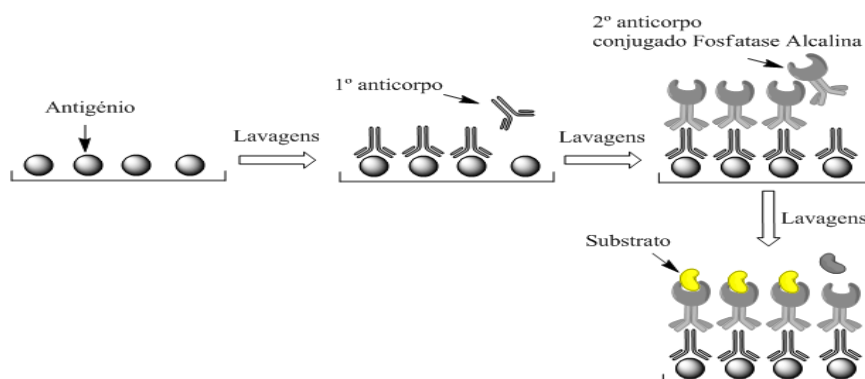


Fig. 2.4 Técnica de ELISA indireta. Estão representados as 4 reações essenciais desta técnica: (1) Sensibilização da placa com o antígeno, (2) Adição do anticorpo primário do soro que queremos analisar; (3) Adição do anticorpo secundário conjugado com uma enzima, normalmente a peroxidase; (4) Adição do substrato para reagir com a enzima conjugada ao 2º anticorpo, resultando na mudança de cor. Desenhado no *software ChemBioDraw*.

2.5.4.1 Título de anticorpos

A placa de 96 poços (*NunClon*, Thermo Scientific, Germany) foi sensibilizada com 100 uL de antígeno akirin (0,5 ug/100 uL), com as respectivas diluições seriadas em cada poço, durante a noite a 4°C (fig. 2.5). A placa foi lavada 3x com TBS-T e bloqueada com 250 uL da solução de bloqueio (tabela A em anexo) durante 1h a temperatura ambiente para ocupar os locais que não são ocupados pelo antígeno e evitar as ligações inespecíficas do anticorpo aos poços da placa. Em seguida, lavou-se novamente a placa 3x e foram adicionados 100 uL dos soros controle e dos soros positivos, ambos diluídos em TBS (1:500), durante 1h a 37°C. Em seguida, lavou-se a placa novamente 5x, e adicionou-se 100 uL do 2º anticorpo produzido em cabra anti-IgG, IgA e IgM de rato conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, USA) diluído 1: 10 000 (v/v TBS-T) durante 1h a 37° C. Após esta incubação, adicionou-se 100 uL do substrato de p-nytrophenylfosfato (Sigma-Aldrich, USA) diluído no tampão de diluição e ficou durante 40 min num local com ausência de luz a 37°C. Por fim, leu-se no espectrofotômetro (TRIAD Series Multimode Detector da *DYNEX Technologies*) com um filtro de 415 nm e os resultados são apresentados em densidade ótica (D.O).

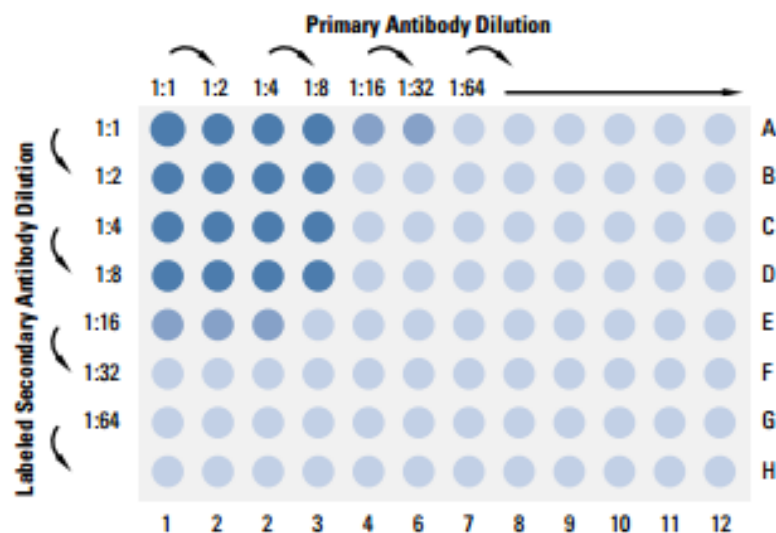


Fig. 2.5 Esquema das diluições seriadas do antígeno (Ag) e do soro do animal imunizado (anticorpo primário), para determinação do título de anticorpos. No poçoA1 coloca-se 100 uL de antígeno com a máxima concentração, e depois dilui-se 1:2 ao longo das linhas de B a G. O mesmo se passa com o anticorpo primário, que é diluído ao longo das linhas Retirado de www.piercenet.com/Files/1602127_Assay_Dev_HB_v2_INTL.pdf [Consultado 1 de Outubro de 2012]

2.6 ENSAIO DE SILENCIAMENTO DO GENE *akirin*

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo regulador da expressão de genes, através do processo de degradação do RNA proveniente da transcrição. Durante este processo a presença do RNA de cadeia dupla (dsRNA) no citoplasma da célula funciona como um indutor do processo de RNAi, devido à sua ligação às moléculas de RNA mensageiro (mRNA) do gene alvo, levando à sua destruição e, desta forma, impede a acumulação de mRNAs do gene alvo no citosol. A maioria dos organismos eucariotas apresenta este sistema de RNAi naturalmente de forma a impedir a invasão por outros elementos genéticos móveis, tais como vírus ou transposões.

De um modo geral o que acontece quando estas moléculas de dsRNA se encontram no interior da célula, é provocar uma ativação de uma enzima da família RNaseIII, chamada DICER, que digere as moléculas de dsRNA em pequenas moléculas de RNA (siRNA) com um tamanho variável entre 21 e 25 nucleótidos. Por sua vez estas pequenas moléculas de RNA ligam-se a um complexo proteico, formando o RISC (*RNA-induced silencing complex*), que é ativado na presença de ATP de forma a permitir que a cadeia *anti-sense* fique exposta e consequentemente por homologia emparelhe com o mRNA correspondente e este seja cortado, como está ilustrado na figura 2.6 (Fire; *et al.*, 1998; Agrawal *et al.*, 2003).

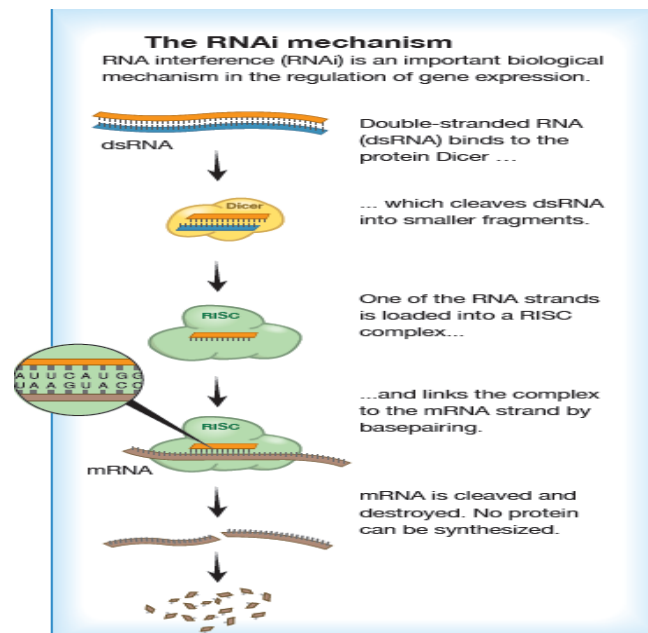


Fig. 2.6 Mecanismo geral de funcionamento do modelo de RNA de interferência através do RNA de cadeia dupla (dsRNA). Retirado de http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html [Consultado 25 de Junho de 2012]

2.6.1 Produção de dsRNA

Tendo como objetivo o silenciamento do gene *akirin* em mosquitos, foram desenhados *primers* com base na sequência do gene (*Vectorbase*: AGAP006809). Foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando como molde DNA complementar (cDNA) de *An. gambiae* s.s.. As condições seguidas e reagentes utilizados estão descritos nas tabela C e G, respectivamente, em anexo.

Um gene exógeno de murganho, *beta-2microglobulina* (*b2m*) (*GenBank*: NM_009735), foi igualmente usado para produzir dsRNA. Como descrito em cima, um par de *primers* que incluíam a sequência T7 do promotor mais 22 bp da sequência do gene *b2m* foram utilizados para amplificar o gene a partir de cDNA de *Mus musculus* (tabela B e G, respectivamente, em anexo). Os *primers* específicos para cada gene estão descritos na tabela F, em anexo.

Cada produto de PCR foi purificado usando o *kit* de purificação *illustra GFX PCR and DNA Gel Band Purification* (GE Healthcare, USA), e posteriormente 1µg de produto purificado foi utilizado como molde para sintetizar dsRNA através da transcrição *in vitro* usando o *MEGAscript T7 kit* (Ambion, USA) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do dsRNA foram medidas através de espectrometria (*NanoDrop* 1000, Thermo Scientific, Germany) e em gel de 1.5% (m/v) de agarose (Figura 2.7).

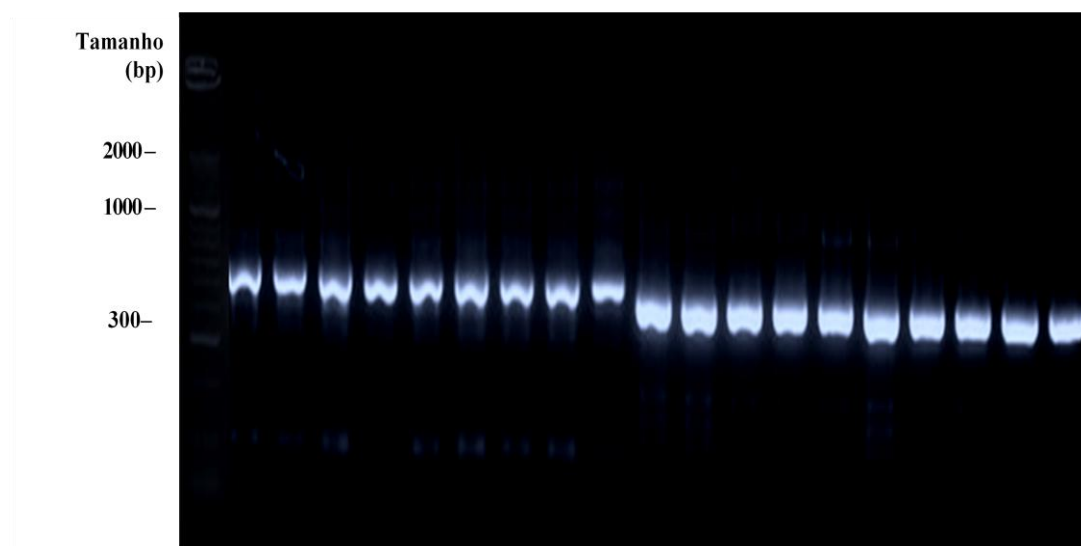


Fig. 2.7 Fotografia de um gel de agarose a 1,5% após electroforese de 1 uL de amostras de dsRNA dos genes *akirin* e *b2m*. Poços 1- 9 correspondem ao dsRNA do gene *akirin* (509 bp), enquanto os últimos 10 poços correspondem ao gene *b2m* (447bp). Marcador *HyperLadder II*, 50 – 2,000 bp (100 lanes)

2.6.2 Silenciamento do gene *akirin*

Mosquitos fêmeas de *A. gambiae* s.s. com 2-3 dias de idade, foram anestesiados em gelo e injectados no tórax com 69 nL de uma solução de dsRNA com uma concentração aproximadamente de 3 ug ul⁻¹ (~ 207 ng) de cada gene, como está representado na figura 2.8. Nestes ensaios de silenciamento, o grupo controlo foi injetado com dsRNA B2M, para servir de referência em relação à intensidade de infeção e para quantificação dos níveis de expressão do gene em estudo.

Todas as injeções dos mosquitos foram realizadas com um sistema de microinjeção (*Nanoinject*; Drummond Scientific, USA). O silenciamento do gene foi confirmado 4 dias após a injeção por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) em que se utilizou o gene ribossomal *s7* (*Vectorbase*: AGAP010592) para normalização da expressão, uma vez que é um gene constitutivo.



Fig. 2.8 Microinjeção dsRNA no tórax de um mosquito fêmea *An. gambiae* s.s.

2.6.3 Infeção dos mosquitos por *Plasmodium berghei*

No 4º dia após a injeção os mosquitos foram alimentados em murganhos infetados com *P. berghei*, de acordo com o ponto 2.4. Durante a alimentação foram realizadas trocas regulares entre os murganhos das gaiolas, para obviar eventuais diferenças de parasitemia entre os murganhos.

2.6.4 Recolha de tecidos para confirmação do silenciamento, análise da intensidade de infeção e contagem de ovos por fêmea

Para os mosquitos silenciados, foram recolhidos os intestinos médios de aproximadamente 30 mosquitos 4 dias após o silenciamento e imediatamente antes da alimentação. Os mosquitos foram dissecados e os intestinos médios transferidos para 300 uL de solução *RNAlater* (Ambion, USA), e no final foram armazenados a -20°C até à extração de RNA.

Oito dias pós-infeção, os mosquitos fêmeas foram dissecados e em cada uma contou-se o nº de ovos no interior do abdómen e recolheu-se o intestino médio para determinar a intensidade de infeção (nº de oocistos / mosquito) por microscopia (*Axioskop*, Carl Zeiss). Foi também recolhido o corpo gordo para análise do silenciamento. Foram realizadas 4 réplicas biológicas independentes.

2.6.5 Quantificação da expressão do gene *akirin*

O RNA total do intestino médio e do corpo gordo de cada mosquito foi extraído com recurso ao *Nucleospin RNAII kit* (Macherey-Nagel, França) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria (*NanoDrop*, Thermo Scientific, Germany). Posteriormente, foi realizado um RT-qPCR de dois passos, no qual primeiramente foi sintetizado o cDNA utilizando *primer* Oligo dT (Roche, Switzerland) e a enzima *MMLV Reverse Transcriptase* (Promega, USA) de acordo com as indicações do fabricante. Num segundo passo a expressão do gene foi quantificada por PCR em tempo real com a *iQ™ SYBR® Green Supermix* (BioRad, USA) no termociclador *iCycler iQ™* (BioRad, USA). Sempre que necessário foi igualmente usado o *kit*, *iScript One-Step RT-PCR Kit With SYBR* (BioRad, USA), cuja diferença é as reações de transcrição reversa e de PCR em tempo real que ocorrerem num só passo. As concentrações dos reagentes das reações do PCR em tempo real estão nas tabelas H e I, em anexo; e as condições seguidas na realização do mesmo estão nas tabelas C, D e E, em anexo.

As quantificações por RT-qPCR foram feitas em triplicado. Para a confirmação do silenciamento do gene, os *primers* utilizados para amplificar o fragmento por RT-qPCR foram diferentes dos utilizados para amplificar o fragmento para produzir o dsRNA, de forma a não haver influência nas quantificações do gene.

Os resultados da quantificação foram normalizados com o gene que codifica para a proteína ribossomal S7 e o silenciamento foi analisado pelos métodos CT comparativo ($\Delta\Delta CT$). Os *primers* utilizados estão descritos na tabela F em anexo. Foram realizados 3 ensaios independentes.

2.6.6 Análise da quantidade da proteína akirin por Eletroforese de proteínas em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

2.6.6.1 SDS-PAGE

A quantidade de akirin em extratos de mosquitos silenciados e extratos controlo foi analisada por densitometria. Neste sentido foi realizada uma eletroforese em gel de 12% (m/v) de poliacrilamida (*PAGE-GEL*, Pronadisa, Spain) num sistema Mini protean III (BioRad, USA), e adicionou-se o tampão de corrida (Tabela J, nos anexos). Às amostras proteicas foi adicionado o tampão de amostra (Tabela J, nos anexos), de modo a obter uma concentração final de 60 ng/poço. Em seguida as amostras foram sujeitas a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos para desnaturar as proteínas, e carregou-se em cada poço do gel 35 μ L de amostra. A separação ocorreu a uma voltagem constante de 90V.

O gel obtido foi corado com *comassie blue* (Promega, USA) durante 1h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens com água destilada.

A densitometria das bandas foi analisada com o *software* ImageJ versão 1.42. utilizando o guia do usuário que acompanha o programa.

2.7 CONTAGEM DO N° DE OVOS, MORTALIDADE, TAXA E INTENSIDADE DE INFECÇÃO

A mortalidade em cada uma das gaiolas dos mosquitos foi registada diariamente. A oviposição foi igualmente registada com uma periodicidade diária nos ensaios de alimentação natural. Nos ensaios de silenciamento foi contado o número de ovos no interior de cada fêmea quando dissecadas. Ao oitavo dia pós-infecção as fêmeas presentes nas gaiolas foram dissecadas e contados os n° de ovos no interior do abdómen e recolhido o intestino médio para determinar a intensidade de infecção (n° de oocistos / mosquito) por microscopia (*Axioskop*, Carl Zeiss).

Foram realizadas 3 réplicas biológicas da experiência de alimentação natural e 4 réplicas biológicas da experiência de silenciamento.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dado não existir uma distribuição normal relativamente ao nº de ovos e ao nº de oocistos (intensidade de infeção), não foi possível comparar as amostras independentes pelo teste paramétrico *Student's t-test*, portanto a análise foi feita com base no teste não-paramétrico *Mann-whitney* (MW). Relativamente às diferenças na taxa de infeção entre os dois grupos, estas foram analisadas usando o teste do Chi-quadrado. A comparação entre os níveis de expressão do mRNA entre os dois grupos foi feita usando o teste de *Mann-Whitney*. As curvas de sobrevivência foram analisadas com base no teste estatístico *Log-rank (Mantel Cox)*.

A comparação dos títulos de anticorpos entre os murganhos controlo e imunizados foi realizada com recurso ao teste estatístico *Student's t-test*.

Estes testes estatísticos foram realizados com recurso ao *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), exceto a análise das curvas de sobrevivências que foram realizadas no *software GraphPad Prism*.

Os gráficos foram realizados com recurso ao *software GraphPad Prism*.

3. RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS ANTICORPOS ANTI-AKIRIN SOBRE MOSQUITOS *Anopheles gambiae* s.s. INFETADOS COM *Plasmodium berghei*

3.1.1 Caracterização do efeito dos anticorpos anti-akirin em mosquitos alimentados em murganhos imunizados

Os efeitos dos anticorpos anti-akirin em mosquitos alimentados em murganhos imunizados foram avaliados de acordo com o procedimento anteriormente referido. Para cada imunização foi quantificada a resposta dos murganhos BALB/C inoculados com a proteína recombinante akirin formulada para vacinação (Figura 3.1). A resposta dos anticorpos nos murganhos foi significativamente mais alta ($p < 0,0001$) quando comparado com os controlos. O título de anticorpos correspondente à última imunização foi de 1:6400.

Foram realizados apenas duas réplicas da alimentação natural em hospedeiros imunizados.

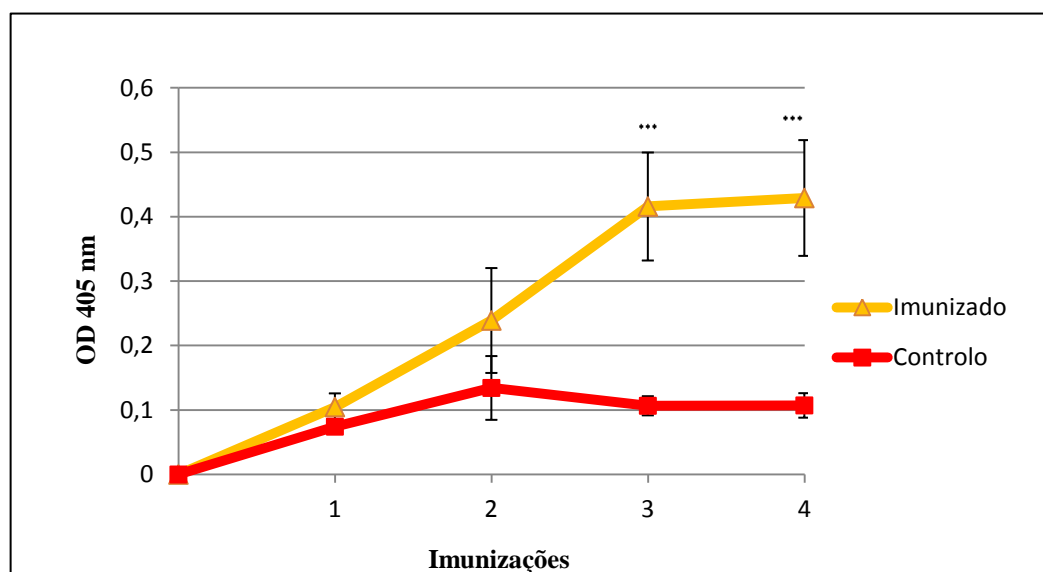


Fig. 3.1 Resposta dos anticorpos nos murganhos BALB/C durante as 4 imunizações. Resposta dos anticorpos avaliada por ELISA. Comparações entre o grupo controlo e o grupo imunizado pelo teste estatístico *Student's t-test*. *** Representa $p < 0,0001$.

3.1.2 Efeito dos anticorpos dos murganhos imunizados com *Anopheles gambiae* s.s. - Alimentação natural

Os efeitos dos anticorpos à proteína recombinante de *Aedes albopictus* foram avaliados nos mosquitos fêmeas *An.gambiae* s.s. alimentados em murganhos imunizados,

através de 3 parâmetros: (i) mortalidade; (ii) intensidade de infecção; (iii) oviposição e produção de ovos.

Sob condições experimentais referidas anteriormente no ponto 2 dos materiais e métodos, a maioria das fêmeas devem ter acasalado logo após a sua emergência e o sucesso da alimentação foi idêntico para os dois grupos durante os ensaios, isto é, a percentagem de fêmeas alimentadas foi superior a 85% em ambos os grupos.

3.1.2.1 Efeitos na infecção por *Plasmodium berghei*

Com o objetivo de avaliar o efeito da akirin na infecção por *P. berghei* em mosquitos, os murganhos imunizados foram posteriormente infetados com *P. berghei*, como anteriormente descrito. Oito dias após alimentação, as fêmeas foram dissecadas e a infecção avaliada quantitativamente pela contagem de oocistos em cada intestino médio. Como se pode verificar os resultados demonstram que a infecção não foi bem-sucedida no grupo imunizado e no grupo controlo, resultando numa taxa de infecção de 24% e 33%, respetivamente. A intensidade de infecção foi de 6 oocistos por mosquito em ambos os grupos. Não foram observadas diferenças de infecção entre ambos os grupos. Os dados da intensidade de infecção estão representados em baixo pela figura 3.2 e pela tabela 3.A.

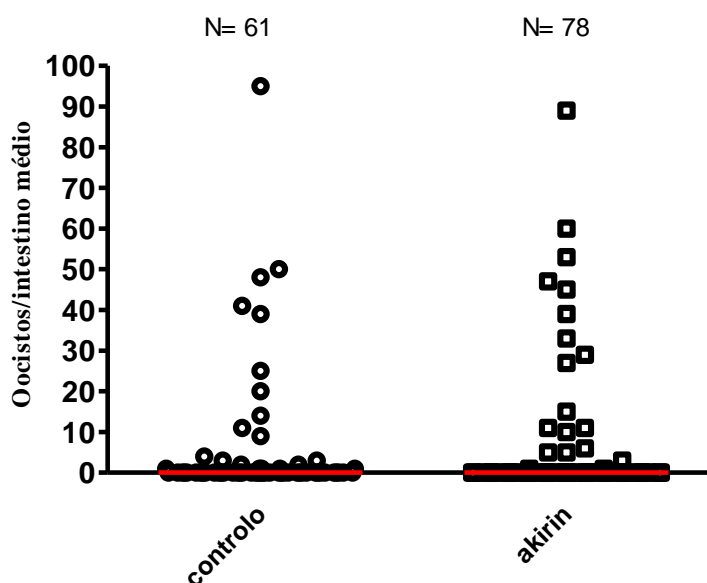


Fig. 3.2 Efeito dos anticorpos anti-akirin em *An. gambiae* s.s., 8 dias após a refeição em murganhos infetados com *P. berghei*. Os círculos e os quadrados representam o número de oocistos presentes em cada intestino médio e a mediana está indicada pela linha horizontal vermelha. N é o nº total de mosquitos analisados. A distribuição dos oocistos foi comparada usando o teste não paramétrico de MW .

Tabela 3.A Efeito dos anticorpos anti-akirin no desenvolvimento da infecção por *P.berghei* em *An. gambiae s.s.*

Grupo	N	Mín	Máx	Média	Mediana	Mediana s/zeros	p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾	Taxa de infecção ⁽³⁾
Controlo	61	0	95	6	0	6,5			24%
Akirin	78	0	89	6	0	15	>0,05	>0,05	33%

(1) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o control usando o teste não paramétrico de MW; (2) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o control usando o teste Kolmogorov-Smirnov; (3) (nºde mosquitos infetados/nºtotal de mosquitos) x 100.

3.1.2.2 Efeitos na oviposição e produção de ovos nas fêmeas *Anopheles gambiae s.s.*

O número de ovos resultantes das posturas das fêmeas foi contado diariamente após a alimentação. A postura iniciou-se a partir do 4º dia após a alimentação, prolongando-se até ao 8º dia. Os mosquitos fêmeas do grupo tratado colocaram no total 250 ovos, enquanto os mosquitos fêmeas do grupo controlo colocaram apenas 80 ovos, tendo em conta os 8 dias de duração das experiências (Figura 3.3). Os dados obtidos demonstram que os mosquitos do grupo tratado realizaram posturas em maior quantidade do que os mosquitos do grupo controlo. Estes resultados podem ser devidos ao facto da temperatura ideal para o desenvolvimento gonotrófico por parte das fêmeas *An. gambiae s.s.* ser de 26°C, e o ensaio ter decorrido a 21°C, a temperatura ideal para o desenvolvimento da infecção por *P. berghei*.

Das posturas de ovos realizadas pelos dois grupos, a percentagem de ovos que eclodiram foi idêntica em ambos os grupos, 41% no grupo tratado/akirin e 39% no grupo controlo (Tabela 3.B).

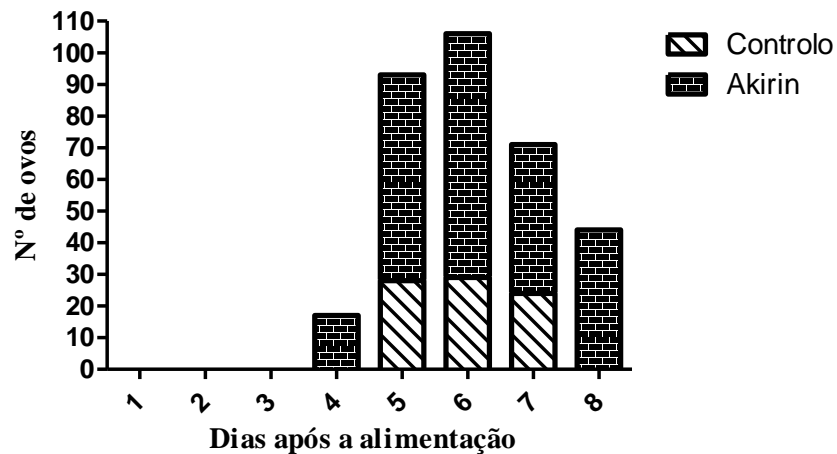


Fig. 3.3 Efeito dos anticorpos na oviposição diária de mosquitos *An. gambiae s.s.* As barras representam o número de ovos colocados em cada dia dos ensaios. Oviposição analisada pelo teste não paramétrico de MW, não existem diferenças significativas.

De um modo geral, verifica-se que as fêmeas *An. gambiae s.s.* atingem o pico de posturas 2-3 dias após a alimentação. De acordo com os resultados obtidos é possível verificar um atraso no seu desenvolvimento gonotrófico, por conseguinte, no dia 8 foram contados o número de ovos no interior dos abdômens de cada uma das fêmeas de ambos os grupos (Fig.3.4).

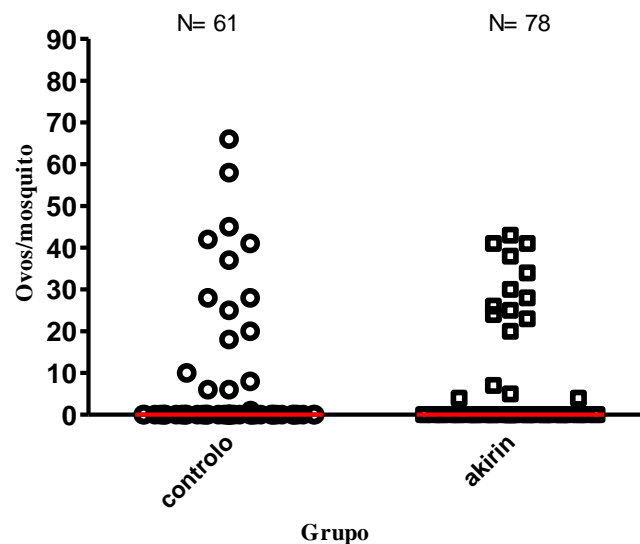


Fig. 3.4 Efeito dos anticorpos anti-akirin na produção de ovos em mosquitos *An. gambiae s.s.* Os círculos e os quadrados representam o número de ovos presentes em cada abdômen das fêmeas dissecadas, a mediana está representada pela linha horizontal vermelha. N é o nº total de mosquitos analisados. A distribuição dos ovos foi comparada usando o teste não paramétrico de MW.

Verificou-se que o número de ovos por fêmea é ligeiramente superior no grupo controlo do que no grupo tratado, provavelmente como consequência do segundo grupo

ter realizado mais posturas e em maior quantidade. Todos os dados relativos à produção de ovos e oviposição, encontram-se resumidos na tabela 3.B.

Tabela 3.B Efeito dos anticorpos anti-akirin na oviposição e na produção de ovos pelas fêmeas *An.gambiae s.s.*

Grupo	N	Mín	Máx	Média	Medi- -ana	p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾	%Ovos atrofiados ⁽³⁾	Ovip. ⁽⁴⁾	%Ovos eclodidos
Controlo	61	0	66	7	0			19	80	39
Akirin	78	0	43	5	0	>0,05	>0,05	12	250	41

(1) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o controlo usando o teste não paramétrico de MW; (2) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o controlo usando o teste Kolmogorov-Smirnov; (3) (nº de ovos com um desenvolvimento incompleto/nº total de ovos) x 100; (4) Oviposição - nº total de ovos postos em cada grupo.

3.1.2.3 Efeitos dos anticorpos anti-akirin na sobrevivência dos mosquitos *Anopheles gambiae s.s.*

O efeito dos anticorpos anti-akirin na sobrevivência dos mosquitos *Anopheles gambiae s.s.* alimentados em murganços controlo e em murganços imunizados foi analisado de acordo com as metodologias já descritas. Da observação da figura 3.5 é possível verificar que não existem diferenças na mortalidade entre os mosquitos dos dois grupos, uma vez que a percentagem de sobrevivência no grupo controlo é de 48% e no grupo imunizado é de 50%. Estas diferenças não foram significativas ($p>0,05$).

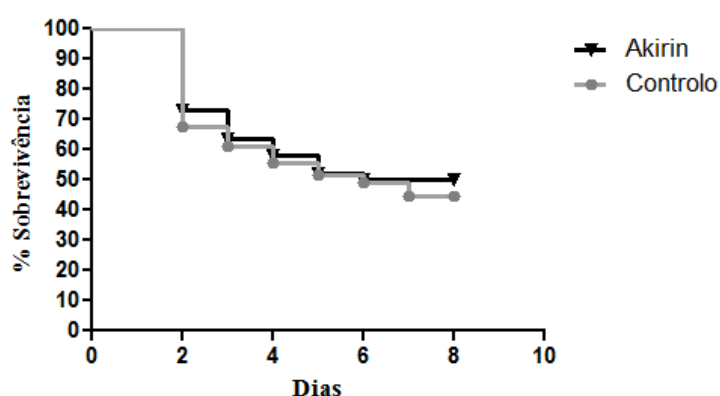


Fig. 3.5 Efeito dos anticorpos anti-akirin na sobrevivência de mosquitos *An.gambiae s.s.* A linha cinzenta representa a taxa de sobrevivência dos mosquitos no grupo controlo ao longo dos 8 dias dos ensaios. A linha preta representa a taxa de sobrevivência do grupo alimentado em murganços imunizados.

3.2 CARATERIZAÇÃO DO GENE *akirin*

3.2.1 Efeito do silenciamento em *Anopheles gambiae* s.s.

Com o objetivo de quantificar o efeito do silenciamento do gene de interesse, foram realizadas quatro réplicas biológicas. No total foram analisados 340 indivíduos do grupo de mosquitos injetados com dsRNA controlo, denominado por grupo controlo, e 277 indivíduos do grupo de mosquitos injetados com dsRNA *akirin*, denominado como grupo *akirin* ou grupo silenciado. Os efeitos do silenciamento foram analisados, essencialmente, através de 3 parâmetros: (i) intensidade de infeção e taxa de infeção; (ii) produção de ovos, através da contagem do número de ovos no interior do abdómen de cada fêmea; e (iii) sobrevivência.

3.2.1.1 Quantificação do silenciamento por RT-qPCR

O silenciamento foi analisado a partir dos intestinos médios recolhidos das fêmeas *An. gambiae* s.s. 4 dias após a injeção de dsRNA. As taxas de silenciamento estão representadas na figura 3.6, as maiores taxas de silenciamento neste tecido ocorrem nos ensaios 1 e 2, em 34% e 39% respetivamente. A taxa de silenciamento obtida no ensaio 3 foi a mais baixa (5%), enquanto no 4º e último ensaio foi de 16%.

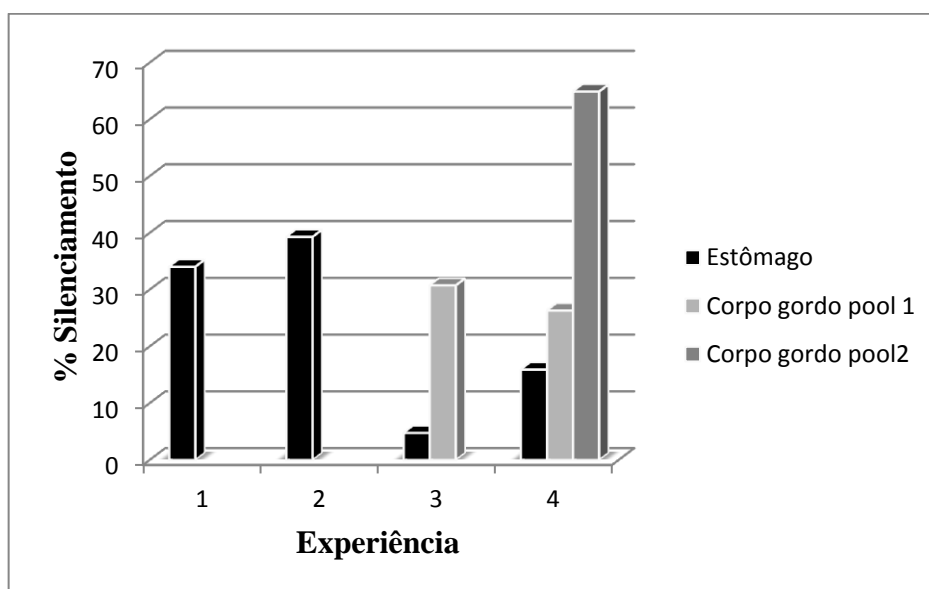


Fig. 3.6 Taxas de silenciamento do gene *akirin*, medidas por RT-qPCR. As barras pretas representam a percentagem de silenciamento do gene *akirin* no intestino médio; as barras cinzentas claras representam a taxa de silenciamento no *pool* nº1 dos corpos gordos nas experiências 3 e 4; as barras cinzentas escuras representam a taxa de silenciamento no *pool* nº2 dos corpos gordos na experiência 4 (este *pool* era constituído por mosquitos sem infeção e sem produção de ovos).

Em paralelo, foram recolhidos os corpos gordos para quantificação da taxa de silenciamento, também neste tecido. As fêmeas injetadas com dsRNA *akirin* da experiência 4 foram separadas em 2 *pools*, denominados de “Akirin Corpo gordo *pool 1*” e “Akirin Corpo gordo *pool 2*”. Esta divisão permitiu analisar separadamente a taxa de infecção de silenciamento nos mosquitos que não tinham ovos, nem infecção, de forma a inferir se esse acontecimento seria um efeito do silenciamento ou uma ocorrência ocasional. Como se pode observar pelos dados presentes na tabela K em anexo, as fêmeas do 2º *pool* não apresentavam qualquer ovo no interior do seu abdómen e não apresentavam infecção.

As taxas de silenciamento referentes a cada um dos *pools* do corpo gordo das experiências 3 e 4, estão representadas na figura 3.6. É possível observar que a percentagem de silenciamento no único *pool* de corpos gordos da 3ª experiência foi de 31% (barra cinzenta mais clara), enquanto na 4ª experiência os dois *pools* de corpos gordos tiveram um silenciamento de 26% e 65% (barras cinzenta clara e cinzenta escura, respetivamente).

3.2.1.2 Comparação dos níveis de expressão de mRNA do gene *akirin*

A expressão dos níveis de mRNA do gene *akirin* obtidos recorrendo à técnica de PCR em tempo real, foram comparados entre o grupo controlo e o grupo silenciado (Figura 3.7). Os resultados obtidos indicam que os níveis de mRNA no grupo silenciado são inferiores ao do grupo controlo, quer nos *pools* de intestinos médios (Fig. 3.7 A) como nos *pools* correspondentes ao corpo gordo (Fig. 3.7 B), embora essa diferença seja mais notória no corpo gordo. As diferenças são estatisticamente significativas no corpo gordo ($p < 0,0001$), contudo nos intestinos médios não o são.

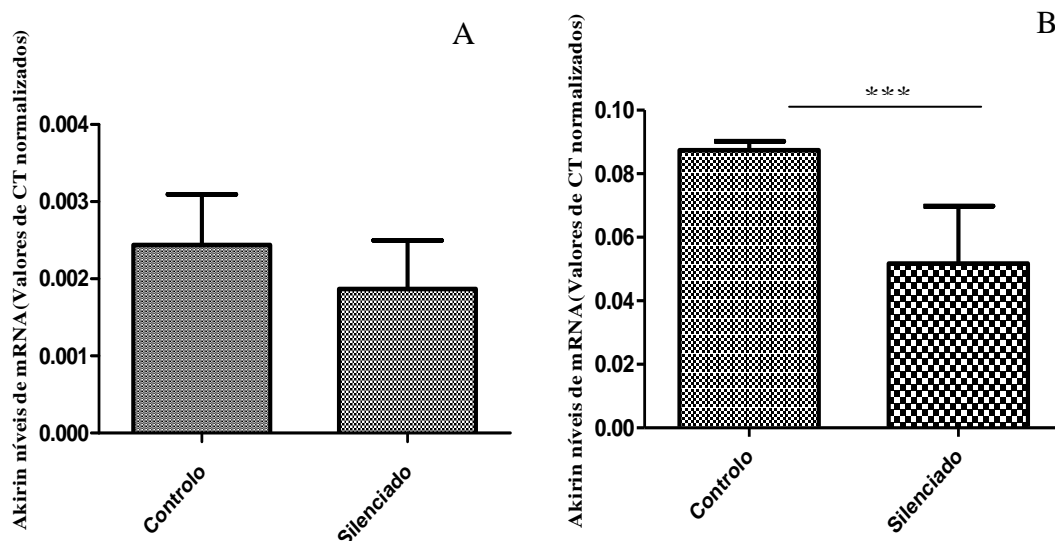


Fig. 3.7 Níveis de mRNA akirin no controlo (injetado com dsRNA B2M) e no grupo silenciado (injetado com dsRNA Akirin). Na figura A está representado os níveis de mRNA nos intestinos médios recolhidos antes da alimentação infetante com *P.berghei*. Na figura B está representado os níveis de mRNA nos corpos gordo recolhidos 8 dias após a refeição infetante com *P.berghei*. Os dados estão representados pela média com o desvio padrão. Foi utilizado o teste não paramétrico MW.

3.2.1.3 Análise do silenciamento por densitometria das bandas do gel SDS-PAGE

As bandas obtidas através do gel SDS-PAGE realizado a partir dos extratos proteicos de mosquitos silenciados e controlo, foram analisadas por densitometria para aferir a quantidade de proteína existente nas bandas correspondentes à akirin (fig.3.8). A proteína akirin de *Anopheles gambiae* s.s. tem um peso molecular de 22,665 kDa (tamanho da subolesin [SUB] de *Ixodes scapularis* 20,522 kDa).

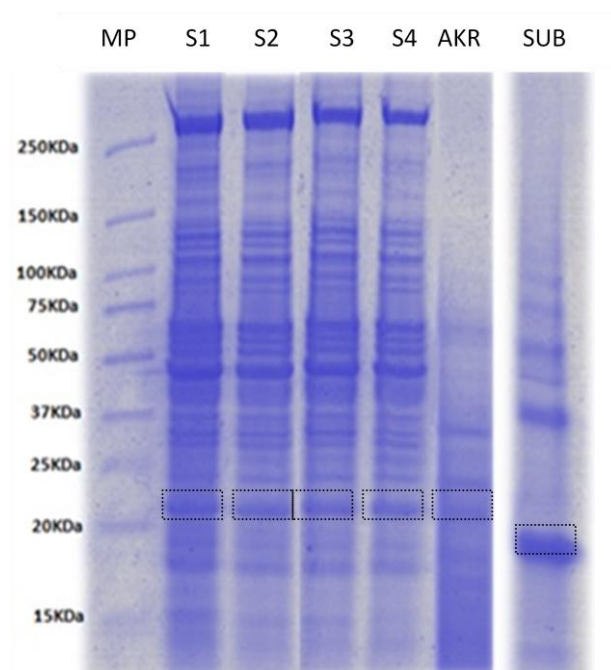


Fig. 3.8 Gel SDS-PAGE realizado com os extratos proteicos dos *pools* de corpo gordo dos mosquitos silenciados e dos mosquitos controle, para análise de densitometria. As bandas marcadas com os retângulos a tracejado correspondem, teoricamente, à akirin de *An.gambiae* s.s., que tem um peso molecular teórico de 22,665 kDa. Abreviaturas:MP- Marcador de peso molecular; S1 – Amostras da 3ª experiência silenciado; S2 – Amostras da 3ª experiência controle; S3 – Amostras da 4ª experiência silenciado; S4 – Amostras da 4ª experiência controle; AKR – proteína recombinante Akirin controle de *Aedes albopictus* produzida em *Pichia pastoris* (peso molecular teórico 22,54 KDa); SUB – proteína recombinante Subolesin de *Ixodes scapularis* (peso molecular teórico 20,522 KDa).

Na tabela 3.C estão resumidos os resultados da densitometria relativamente à banda da akirin. Como é possível observar os extratos proteicos dos *pools* de corpo gordo silenciado da 3ª e 4ª experiências têm menos quantidade de proteína do que os respetivos controlos.

Tabela 3.C Comparação dos resultados da análise densitométrica dos extratos proteicos de corpo gordo e dos resultados de silenciamento obtidos a partir dos níveis de mRNA dos *pools* de corpo gordo.

Denominação no gel	Amostra	Densitometria	Silenciamento (RT-qPCR)
S1	3ª experiência silenciado	2.6%	31%
S2	3ª experiência controle	4%	-
S3	4ª experiência silenciado	2.5%	65%
S4	4ª experiência controle	4.5%	-

A correlação entre o silenciamento analisado por RT-qPCR a partir do RNA extraído das amostras de mosquitos e o silenciamento analisado por densitometria no gel SDS-PAGE a partir de extratos proteicos, é elevado (Fig.3.9). Isto significa que quanto maior a percentagem de silenciamento, menor a percentagem de proteína akirin existente nos extratos proteicos de mosquitos silenciados.

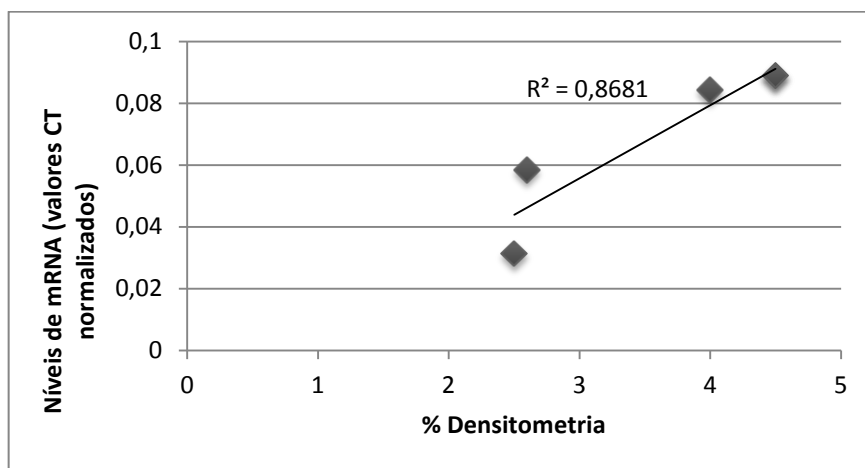


Fig. 3.9 Correlação entre o silenciamento analisado por RT-qPCR e o silenciamento analisado por densitometria no gel SDS-PAGE.

3.2.1.4 Intensidade de infecção por oocistos de *P. berghei*

Na figura A1 em anexo, estão representadas imagens obtidas por microscopia de fluorescência de intestinos médios infetados com oocistos de *P.berghei*, pertencentes a fêmeas tratadas e controlo.

Os resultados obtidos por contagem de oocistos em todos os intestinos médios distribuídos pelas 4 experiências, sugerem que a intensidade de infecção é maior nos intestinos médios dos mosquitos do grupo akirin do que nos dos mosquitos controlo (Figura 3.10). A mediana da intensidade da infecção, representada pelo traço vermelho no gráfico, é de 16 oocistos no grupo controlo e de 31 oocistos no grupo akirin. O aumento da infecção no grupo akirin relativamente ao controlo é de 39%, sendo esta diferença de intensidade de infecção entre os dois grupos estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), tabela 3.D.

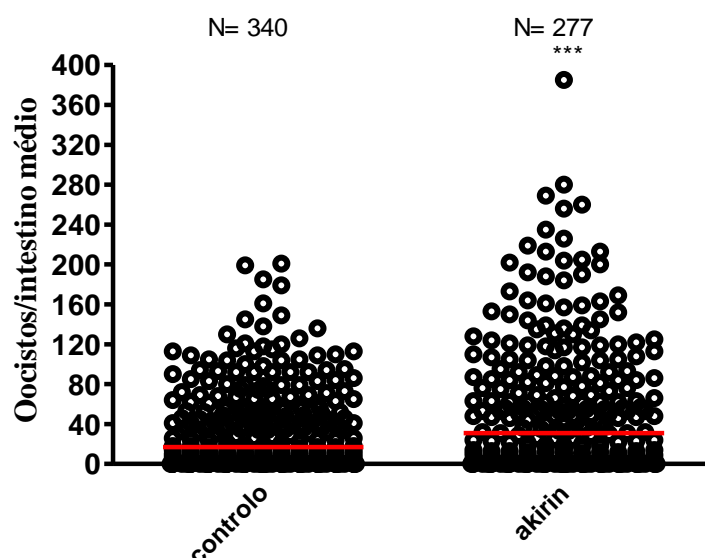


Fig. 3.10 Análise do efeito do silenciamento do gene *akirin* na infecção com *P.berghei* 8 dias após a refeição infectante para os mosquitos *An. gambiae* s.s.. Os círculos representam o número de oocistos presentes em cada intestino médio, mediana está representada pela linha horizontal vermelha. N é o nº total de mosquitos analisados. A distribuição dos oocistos foi comparada usando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, *** indica diferenças significativas ($p < 0,0001$).

Nesta tabela estão resumidos os dados da intensidade de infecção entre o grupo controle e o grupo silenciado. Na primeira metade da tabela consta a análise dos resultados com todos os mosquitos das 4 experiências, e na metade inferior da tabela consta uma análise idêntica, mas sem os mosquitos que tinham intensidade de infecção igual a zero. Esta segunda análise foi realizada com o intuito de verificar se as diferenças se mantinham entre os dois grupos, uma vez que do total de todos os mosquitos analisados, os que não têm infecção são um número significativo e têm uma grande influência na análise dos dados. No entanto, como se pode verificar os resultados são iguais e as diferenças entre os dois grupos continuam a existir.

Tabela 3.D Efeito do silenciamento do gene que codifica a akirin na intensidade de infecção por *P.berghei*.

Grupo	N	Mín	Max	Média	Média Geométrica	Mediana	p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾	% Aumento infecção ⁽³⁾
Controlo	340	0	201	33,26	-	16	<0,0001	<0,005	39% %
Akirin	277	54	385	54,64	-	31			
Controlo*	226	1	201	50,03	29,72	40,50	<0,005	<0,005	32%
Akirin*	207	1	385	73,11	40,02	55			

* Não estão incluídos os mosquitos que apresentavam infecção nula, esta segunda análise foi efetuada para verificar se as diferenças entre os dois grupos se mantinham; (1) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o controlo usando o teste não paramétrico de MW; (2) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o controlo usando o teste Kolmogorov-Smirnov; (3) $100 \times [(média\ akirin - média\ controlo) / média\ akirin]$.

Se observarmos individualmente os resultados de cada uma das experiências comparativamente ao aumento da intensidade de infecção entre o grupo controlo e o grupo akirin, as percentagens das 4 experiências são 51%, 14%, 18% e 53%, respetivamente (Tabela L, em anexo). Portanto verifica-se que há uma tendência dos mosquitos fêmeas tratados terem uma maior intensidade de infecção.

A taxa de infecção das 4 experiências não tem diferenças estatisticamente significativas, porém o número de mosquitos infetados pertencentes ao grupo controlo foi superior do que no grupo akirin (Figura 3.11).

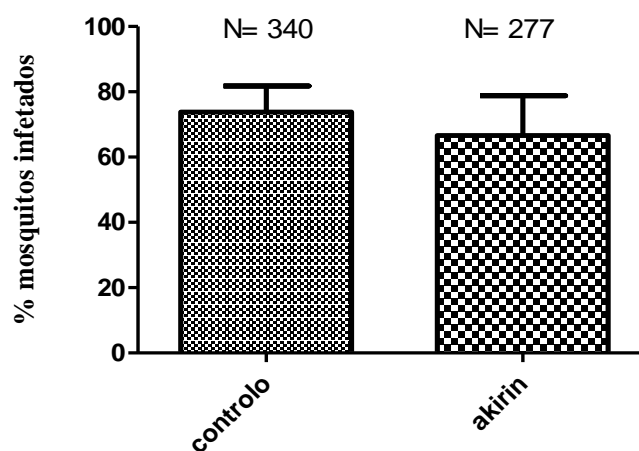


Fig. 3.11 Taxa de infecção 8 dias após a refeição infetante em mosquitos silenciados (dsRNA Akirin) e mosquitos controlo (dsRNA B₂M). Comparação entre as taxas de infecção analisada pelo teste do Chi-quadrado, $p > 0,05$.

Ao correlacionar o silenciamento no intestino médio com a taxa de infecção, verifica-se que existe uma correlação muito elevada o que significa que, quanto maior a taxa de silenciamento no intestino médio, mais baixa é a taxa de infecção, sugerindo que quanto menos expresso está o gene *akirin* no intestino médio, menor é a taxa de infecção e, portanto, menor é o número de mosquitos infectados (Fig.3.12).

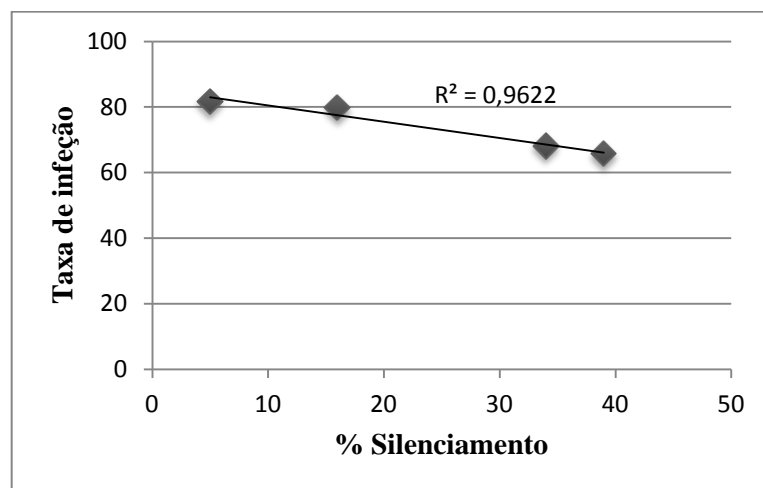


Fig. 3.12 Correlação entre a taxa de silenciamento no intestino médio e a taxa de infecção nos mosquitos em cada réplica biológica. A correlação é muito elevada ($R^2 = 0,9622$), o que significa que quanto maior a taxa de silenciamento, menor o número de mosquitos infectados com *P. berghei*.

3.2.1.5 Na produção de ovos

As eventuais consequências do silenciamento do gene *akirin* foram também estudadas em relação à produção de ovos do mosquito. No final de cada ensaio dissecou-se o abdómen de cada fêmea e contou-se o número de ovos existentes. As medianas correspondentes às 340 fêmeas do grupo controlo e às 277 fêmeas do grupo silenciado (linha vermelha), são de 19 ovos por fêmea e 3 ovos por fêmea, respetivamente (Fig. 3.13). Tal como ocorre com a intensidade de infecção, existem diferenças significativas também ao nível da fertilidade ($p < 0,0001$).

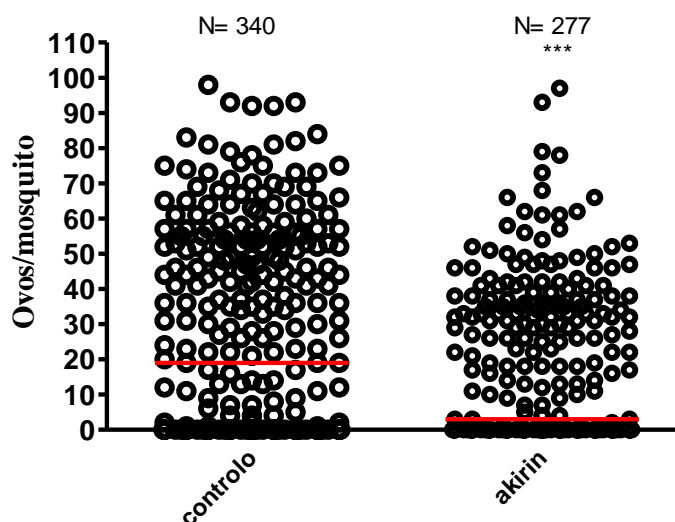


Fig. 3.13 Efeito do silenciamento na produção de ovos em mosquitos *An.gambiae* s.s.. Os círculos representam o número de ovos presentes em cada abdômen das fêmeas dissecadas, a mediana está representada pela linha horizontal vermelha. N é o nº total de mosquitos analisados. A distribuição dos ovos foi comparada usando o teste não paramétrico MW, *** indica diferenças significativas ($p < 0,0001$).

No total das 4 experiências, o silenciamento do gene *akirin* resultou numa inibição de 35% na produção de ovos nas fêmeas do grupo silenciado comparativamente ao grupo controle. A maior inibição na produção de ovos ocorreu nas fêmeas da experiência 1 com 56% de inibição, enquanto nas experiências 2 e 4, essa inibição foi de 35% e 32%, respectivamente. Na experiência 3 verificou-se a menor percentagem de inibição, com 23% (Tabela M, em anexo).

Dado que é principalmente no corpo gordo que ocorre a expressão dos genes responsáveis pela produção de ovos nas fêmeas, como foi mencionado anteriormente, relacionou-se a inibição da fertilidade com o silenciamento quantificado no corpo gordo dos mosquitos; o resultado obtido sugere existir uma correlação elevada ($R^2 = 0,849$), entre estes dois parâmetros (Fig. 3.14).

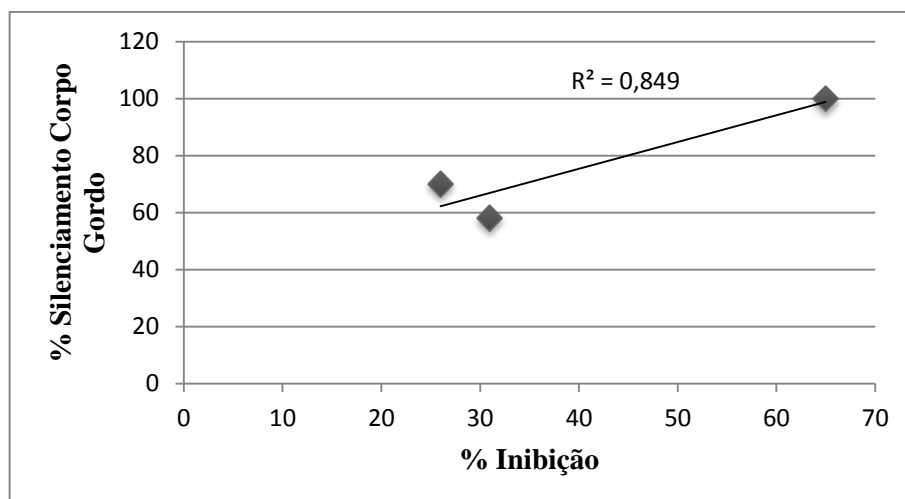


Fig. 3.14 Correlação entre o silenciamento no corpo gordo e a inibição da produção de ovos. A correlação é elevada ($R^2 = 0,849$), sugerindo que quanto maior o silenciamento no corpo gordo, maior a inibição na produção de ovos nas fêmeas silenciadas para o gene *akirin*.

Em paralelo com a avaliação destes parâmetros foi realizada uma observação das características ou formas dos ovos correspondentes aos grupos silenciados e controle. Algumas das fêmeas apresentavam ovos “atrofiados” ou com o desenvolvimento incompleto (Fig. 3.15). Este fenómeno ocorreu em ambos os grupos, sendo a percentagem de ovos atrofiados ligeiramente maior no grupo *akirin* relativamente ao grupo controlo (28% e 24%, respetivamente), não houve uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

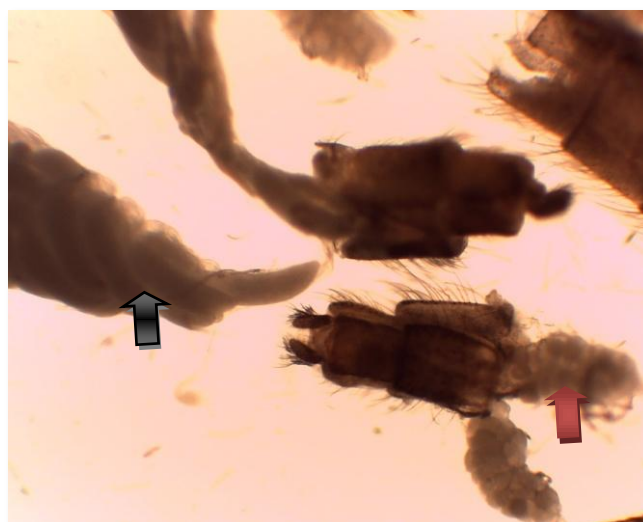


Fig. 3.15 Ovos com desenvolvimento incompleto e ovos completamente desenvolvidos. A seta preta representa os ovos com o desenvolvimento completo, a seta vermelha representa os ovos com um desenvolvimento incompleto. No total 28% das fêmeas do grupo silenciado apresentavam ovos com desenvolvimento incompleto, enquanto no grupo silenciado 24% das fêmeas apresentavam os ovos com um desenvolvimento incompleto ($p > 0,05$).

Todos os dados relativamente aos efeitos sobre a produção de ovos do silenciamento do gene *akirin* encontram-se resumidos na tabela 3.E.

Tabela 3.E Resumo dos dados referentes aos efeitos do silenciamento na produção de ovos das fêmeas *An. gambiae* s.s.

Grupo	N	Mín	Máx	Média	Mediana	p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾	%Ovos atrofiados	%Inibição produção de ovos ⁽³⁾
Controlo	340	0	98	26,33	19			24%	
						<0,0001	<0,0001		35%
Akirin	277	0	97	17,34	3			28%	

(1) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o controlo usando o teste não paramétrico de MW; (2) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o controlo usando o teste Kolmogorov-Smirnov; (3) $100 \times [(méd\acute{e}ia\ controlo - méd\acute{e}ia\ akirin) / méd\acute{e}ia\ controlo]$.

3.2.1.6 Na sobrevivência

A sobrevivência dos mosquitos injetados em ambos os grupos foi registada a cada dois dias até ao final de cada experiência. A tabela 3.F representa as taxas de sobrevivência em cada experiência, e como se pode apurar nas duas primeiras experiências não existe diferenças, contudo nas duas últimas já existe diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência dos mosquitos injetados, onde ocorreu uma maior mortalidade no grupo silenciado do que no controlo. Analisando, em particular, as duas últimas experiências, a taxa de sobrevivência na 3ª experiência é apenas de 50%, enquanto no controlo é de 66%. Na 4ª experiência esta diferença é ainda maior registando-se para o grupo Akirin uma taxa de sobrevivência de apenas 59% e para o grupo controlo 81%.

Tabela 3.F Taxas de sobrevivência em cada uma das 4 réplicas biológicas, com as respectivas percentagens de inibição da sobrevivência. Diferenças na sobrevivência entre os dois grupos analisadas pelo teste estatístico *Log-rank (Mantel Cox)*.

Grupo	1ª Experiência	2ª Experiência	3ª Experiência	4ª Experiência
Controlo	25%	49%	66%	81%
Akirin	26%	52%	50% **	59% ***
% inibição sobrevivência ⁽³⁾	(-)4%	(-)6%	24%	27%

** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$; (3) $100 \times [(média\ controlo - média\ akirin) / média\ controlo]$.

Em baixo está representada a taxa de sobrevivência de todos os ensaios no intervalo dos 12 dias em que decorreram cada uma das experiências (Fig.3.16). No dia 0 os mosquitos foram injetados e, no dia 12, dissecados. Como se pode observar o grupo controlo tem uma taxa de sobrevivência superior relativamente ao grupo silenciado, esta diferença é traduzida por uma inibição da sobrevivência de 17%, e essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

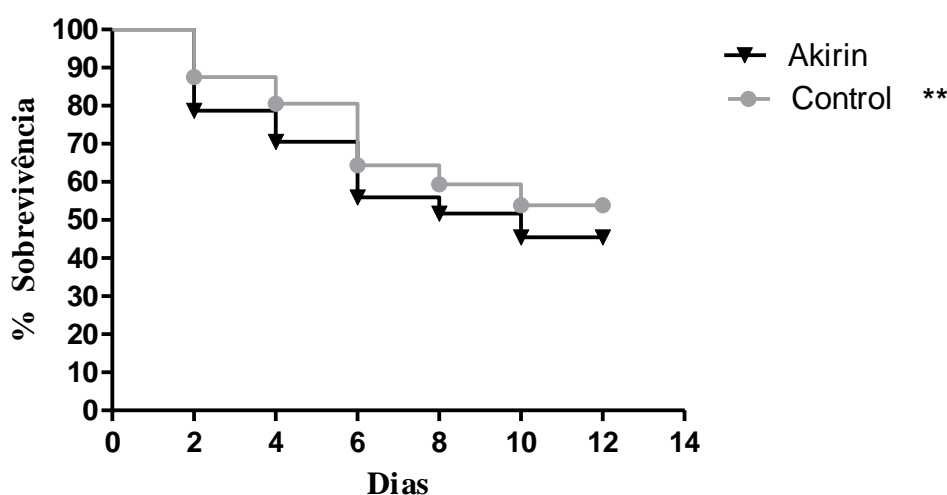


Fig. 3.16 Efeito do silenciamento na sobrevivência de mosquitos *An.gambiae s.s.* As linhas cinzenta e preta representam a taxa de sobrevivência dos mosquitos no grupo controlo injetado com dsRNA B₂M e no grupo silenciado injetado com dsRNA Akirin, respetivamente. Houve uma inibição da sobrevivência de 17%. ** Representa que é estatisticamente significativo ($p < 0,005$).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os custos e as dificuldades associadas à avaliação de antígenos protetores e a vacinação de hospedeiros constituem um obstáculo na descoberta de novos antígenos de mosquitos ou outros vetores. Recentemente, a técnica RNA de interferência foi proposta como método de seleção de antígenos protetores (Almazán *et al.*, 2009). Através de ensaios de larga escala, são selecionadas proteínas correspondentes aos genes silenciados, que produzem maior impacto nos artrópodes vetores, que posteriormente são testadas como antígenos protetores em ensaios de vacinação, o último passo de caracterização dos novos antígenos protetores.

Considera-se um potencial candidato a antígeno protetor contra artrópodes vetores, as proteínas cujos genes estão envolvidos na regulação de outros genes, na síntese de moléculas essenciais para a fisiologia dos artrópodes vetores e que têm um potencial impacto no seu desenvolvimento, tais como crescimento celular, manutenção celular ou mesmo desenvolvimento embrionário. Se as proteínas, selecionadas a integrar uma vacina têm grande homologia com outras proteínas de diferentes artrópodes vetores, poderão ser candidatas contra múltiplos artrópodes vetores.

O estudo aqui apresentado seguiu esta mesma linha de investigação, ou seja, utilizou-se o RNAi para avaliar a importância do gene *akirin* na infecção por *Plasmodium berghei* sp. em *An. gambiae* s.s.. Pretendia-se, com base nos resultados do silenciamento, avaliar se a *akirin* seria um bom candidato a antígeno protetor contra este vetor da malária.

As primeiras evidências da possibilidade de usar a *akirin* como antígeno protetor para afetar a fisiologia de *An. gambiae* s.s. foram obtidas nos ensaios realizados neste trabalho e aqui reportados. A injeção dos mosquitos *An. gambiae* s.s. com dsRNA *akirin* resultou numa diminuição da sobrevivência, inibição da produção de ovos e aumento da intensidade de infecção por *P. berghei*.

O silenciamento obtido foi bastante inferior no intestino médio do que no corpo gordo. Esta diferença não é surpreendente, e pode dever-se a um ou mais fatores, uma vez que a injeção do mosquito foi realizada no tórax e, naturalmente, após a injeção as moléculas de dsRNA chegam até aos restantes tecidos do mosquito através da hemolinfa. Para chegarem até às células do intestino médio, as moléculas de dsRNA têm de atravessar a membrana basal do intestino médio, resultando assim numa diminuição das moléculas de dsRNA que atingem as células desse tecido. O

silenciamento do gene *akirin* no corpo gordo persistiu elevado até 11 dias após a injeção de dsRNA, o que está de acordo com as observações registradas para o gene *subolesin* em carraças, onde níveis elevados de silenciamento foram detetados até 12 dias após a injeção de dsRNA (de la Fuente *et al.*, 2008; Manzano-Román *et al.*, 2011). Estes resultados podem sugerir que 4 dias após a injeção o silenciamento no corpo gordo poderia ser mais elevado, uma vez que o sistema de amplificação de RNAi é ausente nos mosquitos (Manzano-Román *et al.*, 2011).

O gene *akirin* é essencial na via de sinalização Imd e, o silenciamento do mesmo, levou ao aumento significativo da intensidade de infecção por *P. berghei*, uma vez que esta via é fundamental em termos de atividade contra *Plasmodium* spp. (Dong *et al.*, 2006; Garver *et al.*, 2012). É, por isso, expectável que este gene seja um dos genes regulados positivamente ou sobreexpresso durante o processo de infecção por *P. berghei* (Mendes *et al.*, 2011).

As alterações na expressão de vários genes pertencentes à via Imd no restante corpo do mosquito (Dong *et al.*, 2006) reflete uma sinalização inter-tecidos a partir do epitélio do intestino médio para os hemócitos e células do corpo gordo, possivelmente através de moléculas idênticas às citocinas, produzidas pelos vertebrados (Dong *et al.*, 2006). De acordo com os resultados obtidos, a percentagem de silenciamento foi mais reduzida no intestino médio do que no corpo gordo, apesar de ser o intestino médio, o primeiro local de resposta à infecção pelo plasmódio. Estes resultados podem levar a sugerir que este poderá ter sido um fator que contribuiu para a alteração na intensidade de infecção.

Os resultados que se obtiveram indicam que quando o silenciamento é mais elevado no intestino médio, parece existir uma resistência à infecção por *P. berghei*, sugerindo que a expressão do gene *akirin* pode ser importante para o controlo e desenvolvimento das espécies de plasmódio em *An. gambiae* s.s.. Estes mecanismos de controlo de infecção podem ser um resultado da coevolução entre parasitas-vetor (Sinden *et al.*, 2004; Galindo *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos no decorrer dos ensaios sugerem que o gene *akirin* pode estar envolvido em aspetos relacionados com a fertilidade dos mosquitos *An. gambiae* s.s. uma vez que, após o seu silenciamento, se verificou uma inibição da produção de ovos nas fêmeas silenciadas. A forte correlação existente entre o silenciamento no corpo

gordo e a inibição na produção de ovos, parece indicar que a *akirin* é importante neste tecido uma vez que também é um dos genes sobreexpressos nos ovários e no corpo gordo (Marinotti *et al.*, 2005). Uma das hipóteses para esta inibição poderá ser o facto de a *akirin* estar envolvida na expressão de genes importantes na vitelogénese, por exemplo envolvidos na produção das vitelogeninas (lipoproteínas envolvidas na transferência de reservas lipídicas para os oócitos) e/ou nos recetores [*Vitellogenin receptors* – VgRs (Sappington *et al.*, 1996)] que incorporam as vitelogeninas nos oócitos (Raikhel, 1987), uma vez que começam ambos a ser sintetizados pelo sinal nutricional providenciado pelos aminoácidos resultantes da refeição sanguínea (Gulia *et al.*, 2002; Dana *et al.*, 2005). A inibição da produção ao nível da oogénese é menos provável, uma vez que o desenvolvimento inicial dos oócitos nos ovários se inicia logo após a eclosão, anterior ao silenciamento, ficando estes em fase estacionária até à alimentação (Dana *et al.*, 2005). Este efeito do silenciamento já foi reportado anteriormente, em carraças para o gene ortólogo *subolesin* (de la Fuente *et al.*, 2006; Manzano-Román *et al.*, 2011). Outra fator que pode ter contribuído para este resultado pode estar relacionado com uma nutrição insuficiente, isto é, apesar de as fêmeas se encontrarem engorgitadas, o número de ovos por mosquito que matura no primeiro ciclo gonotrófico depende do potencial nutricional da refeição sanguínea (Suneja *et al.*, 2003). O aspeto nutricional pode condicionar o desenvolvimento incompleto dos ovos, mas dificilmente será explicação para a inibição uma vez que ambos os grupos estiveram sob as mesmas condições em termos de alimentação. Por último, a não fecundação dos oócitos não parece ser uma explicação razoável, uma vez que as fêmeas de ambos os grupos cresceram na mesma gaiola, conjuntamente com machos.

O silenciamento de gene *akirin* revelou, como descrito, repercussões ao nível da sobrevivência dos mosquitos fêmeas injetados com dsRNA *Akirin*. Dado que o gene *akirin* regula várias funções biológicas importantes para o mosquito (Nowak, Aihara *et al.* 2012), o seu silenciamento pode ter promovido mortalidade do organismo silenciado. Outras situações/causas podem, no entanto, ser responsáveis pela obtenção destes resultados: (i) injeção dos mosquitos e consequente trauma no local da injeção (tórax); a maioria dos mosquitos morre devido a este processo, normalmente durante os 3 dias pós injeção, contudo existem diferenças na sobrevivência ao longo dos 12 dias de ensaio; (ii) o local da injeção é uma “porta de entrada” para bactérias e outros microrganismos

que acabam por debilitar o mosquito, refletindo-se ainda mais pelo facto dos mosquitos terem uma via de sinalização do seu sistema imunitário comprometida devido ao silenciamento; (iii) os mosquitos não resistiram aos danos provocados pelos oocinetos e posteriormente pelos oocistos, uma vez que não são um vetor natural para o plasmódio utilizado nos ensaios.

A explicação que parece ser mais plausível, de acordo com o publicado por outros autores (Goto *et al.*, 2008; Nowak *et al.*, 2012) aponta para o facto do gene *akirin* estar provavelmente envolvido noutras funções essenciais ao desenvolvimento e sobrevivência do mosquito. Este fenómeno do aumento da mortalidade foi também reportado para o gene ortólogo *subolesin* mas, até ao momento, não se conhecem igualmente, as razões para estes resultados.

Resumindo, os fenótipos resultantes do silenciamento no inseto vetor *An. gambiae* s.s. podem, em certa medida, refletir a eficácia de absorção do dsRNA e silenciamento do gene nos diferentes tecidos e tipos de células para além das funções específicas do gene. Sendo assim, o gene *akirin* tem outras funções importantes além de assistir na função do complexo Rel do sistema imune no combate ao *Plasmodium* spp., tais como na reprodução e outras funções biológicas essenciais para o mosquito completar o seu ciclo de vida.

Estes resultados pareciam indicar que a *akirin* pode vir a ser potencialmente utilizada como vacina contra o mosquito vetor da malária. Assim, foi utilizada a proteína recombinante *akirin* de *Aedes albopictus* para testar a sua eficácia contra o vetor *An. gambiae* s.s. em ensaios de vacinação. Esta proteína foi escolhida porque possui uma homologia de 85% com a de *An. gambiae* s.s. e a sua produção e os protocolos de vacinação já estão padronizados. Esta abordagem permitiu obter informação sobre a reatividade cruzada do antígeno *akirin* entre mosquitos de géneros diferentes, mostrando a aplicabilidade de uma vacina contra múltiplos vetores artrópodes.

Na segunda fase deste estudo, os mosquitos foram alimentados em hospedeiros imunizados, neste caso em murganhos, com o antígeno *akirin* de *Aedes albopictus*, para verificar os efeitos da infeção em *An. gambiae* s.s. enquanto vetor. Os resultados obtidos permitiram verificar que a alimentação natural em hospedeiros imunizados com a proteína recombinante *akirin* não parece ter efeitos sobre nenhum dos parâmetros

verificados anteriormente com o silenciamento. Em relação à infecção, que foi um dos parâmetros mais afetados após silenciamento, na alimentação natural não foram observadas diferenças entre os mosquitos alimentados em murganhos imunizados e controlo.

Relativamente à oviposição, as condições climatéricas ideais para simular as circunstâncias naturais do crescimento e reprodução do vetor *An. gambiae s.s.*, são de 26°C e cerca de 80% de humidade. Sob estas condições, as fêmeas de *An. gambiae s.s.* realizam a postura no segundo dia após a alimentação, atingindo o pico da postura em termos de quantidade de ovos ao 3º dia. Nas nossas experiências, os mosquitos cresceram a 20°C, para proporcionar o desenvolvimento do parasita no vetor. Provavelmente devido a este facto, ocorreu um atraso na oviposição nas experiências relacionadas com a alimentação natural, uma vez que as fêmeas só começaram a realizar posturas de ovos ao 3º dia após a alimentação, prolongando-se durante os oito dias das experiências. Registou-se ainda que só algumas fêmeas apresentavam ovos no seu interior e com diferentes formas de desenvolvimentos (figura 3.15). Observou-se, também, que quanto maior o número de ovos postos, menor a percentagem de fêmeas com ovos no seu interior, como foi o caso do grupo alimentado nos murganhos imunizados ao invés do grupo controlo. Os resultados obtidos nos ensaios de alimentação natural, permitem sugerir que não houve qualquer efeito da vacinação na produção de ovos ou na oviposição, nem na geração subsequente, no número de ovos eclodidos, como reportado em outras espécies de insetos e carraças (Canales *et al.*, 2009; de la Fuente *et al.*, 2011; Moreno-Cid *et al.*, 2011).

Os resultados relativos à sobrevivência, outro dos parâmetros avaliados, sugerem que também não é afetada pela ingestão dos anticorpos anti-akirin em *An. gambiae s.s.*, ao contrário do verificado no silenciamento do gene *akirin*. Em ensaios semelhantes de alimentação natural, realizados também com insetos, foi observado que o maior efeito dos anticorpos incide essencialmente ao nível da reprodução, sendo menos afetada a sobrevivência (Moreno-Cid *et al.*, 2011; Suneja *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos podem levar a indicar que a formulação de uma vacina incluindo a proteína recombinante akirin como antígeno principal pode não ser eficiente. No entanto, estudos anteriores demonstraram resultados positivos como são exemplo os resultados obtidos em mosquitos alimentados artificialmente com

anticorpos anti-akirin, que resultou numa redução da sobrevivência e/ou fertilidade de mosquitos (*An. atroparvus*, *Aedes caspius* e *Culex pipiens*) e ácaros (*Dermanyssus gallinae*) (de la Fuente *et al.*, 2011); resultados semelhantes foram igualmente obtidos em ensaios de alimentação natural envolvendo *A. albopictus* e flebótomos (*P. perniciosus*) nos quais se observou uma redução na oviposição. Nas carraças, a alimentação com anticorpos deu origem a uma diminuição da infestação de *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus microplus* (Canales *et al.*, 2009; de la Fuente *et al.*, 2011).

As diferenças dos efeitos da vacinação obtidos no nosso trabalho, em *An. gambiae* s.s., comparativamente a outras espécies de insetos, pode dever-se a um ou à combinação de diversos fatores. A primeira hipótese é relativa à distância evolutiva entre as espécies e consequente variação nos epítomos antigénicos/imunogénicos, uma vez que esta tem sido apontada como uma explicação para a variação na resposta à vacinação inter-espécies e intra-espécies (Moreno-Cid *et al.*, 2011). É uma hipótese pouco provável, no caso do nosso estudo, uma vez que os mosquitos *A. albopictus* e *An. gambiae* s.s. muito provavelmente têm epítomos conservados devido à sua elevada homologia (85%). A mesma situação foi reportada com *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que têm uma homologia de 89% (Moreno-Cid *et al.*, 2011), sendo assim superior à de outras espécies em que a vacinação tem efeitos positivos. A segunda hipótese, para uma eventual explicação destes resultados pode estar relacionada com as diferenças fisiológicas e no comportamento entre espécies de insetos, ou seja, com o tamanho do abdómen e consequentemente ao volume de refeição ingerido uma vez que a quantidades de anticorpos ingeridos parece estar associado à quantidade da refeição sanguínea, levando a diferenças nos efeitos da imunização, como já fora sugerido por Moreno-Cid e colegas (2011). Por outro lado, os flebótomos ingerem menos quantidade de sangue e a vacinação já demonstrou efeitos positivos (Canales *et al.*, 2009; Moreno-Cid *et al.*, 2011).

Nos anofelíneos, as enzimas digestivas atingem o seu pico em 24-30 h, e a maioria das IgG dos hospedeiros ingeridas nas refeições sanguíneas são digeridas em 48h (Lal *et al.*, 2001), o que pode sugerir que possa ter ocorrido, de alguma forma, a degradação de uma quantidade de anticorpos indefinida. Esta hipótese perde consistência, uma vez que a fisiologia digestiva intra-espécies não deve ser muito variável e já existem trabalhos publicados onde são reportados ensaios de vacinação

anti-akirin em *An. artroparvus* bem sucedidos (Canales *et al.*, 2009; de la Fuente *et al.*, 2011).

A degradação dos anticorpos pode também ocorrer no processo de assimilação da refeição sanguínea mas no momento da passagem do estômago para a hemolinfa, apesar de existir estudos que suportam a hipótese dos anticorpos nos artrópodes, mais concretamente nas carraças, atravessarem intatos o estômago até à hemolinfa (Jasinskas *et al.*, 2000; Canales *et al.*, 2009).

A concentração de anticorpos assimilada pode ter sido insuficiente para afetar as funções da proteína nos diferentes tecidos do mosquito. Esta hipótese pode ser credível, porque os maiores efeitos da vacinação com akirin e subolesin têm sido observados nas carraças (de la Fuente *et al.*, 2011), que são os artrópodes que despendem mais tempo no hospedeiro a alimentar-se, ingerindo assim uma quantidade de volume de refeição sanguínea e, teoricamente, uma quantidade de anticorpos superior. Esta hipótese pode ser suportada pelos resultados obtidos em trabalhos anteriores utilizando alimentação artificial, em que a quantidade de anticorpos ingeridos poderá ser superior (Canales *et al.*, 2009; Moreno-Cid *et al.*, 2011).

Os murganhos utilizados nos ensaios de alimentação natural foram da estirpe BALB/C. Ensaios anteriores envolvendo alimentação natural de mosquitos em murganhos imunizados demonstraram que para condições semelhantes se obtiveram resultados diferentes para estirpes de murganhos BALB/C e CD1 (Moreno-Cid *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem que a estirpe BALB/C possa de algum modo não ser a melhor escolha para este tipo de estudos, apesar do nível de anticorpos obtido após vacinação ter sido elevado.

A conjugação de todos estes fatores ou de alguns deles, pode levar a que a imunização dos hospedeiros seja eficaz contra certos vetores, mas não contra outros.

Outra questão que se coloca sobre a imunização com proteínas intracelulares neste tipo de experiências é a seguinte: Será que é possível a entrada dos anticorpos dentro das células e nos respetivos núcleos para se ligar aos antígenos aí existentes? Uma resposta explícita para esta pergunta ainda não existe, porém existem trabalhos que comprovam a entrada dos anticorpos dentro das células e nos respetivos núcleos (Goto *et al.*, 2008; de la Fuente *et al.*, 2011). Ao que parece o mecanismo de transporte parece ser independente do tamanho molecular, bem como da conformação da proteína e

possivelmente o transporte começa no intestino médio com os recetores de membrana envolvidos na endocitose, e os factos que podem corroborar esta hipótese é a existência de estudos que descrevem recetores para o transporte através das células epiteliais em mamíferos e a ocorrência do transporte das IgG maternas do lúmen do intestino dos animais neonatais para o espaço intersticial (Jasinskas *et al.*, 2000).

Outras questões que se colocam são sobre a autoimunidade que este tipo de imunizações pode despoletar, devido á conservação desta proteína entre invertebrados e vertebrados muito provavelmente existem alguns epítomos conservados, o que poderia resultar em danos nos hospedeiros. Todavia é esperado que a resposta dos anticorpos sejam primariamente direcionada contra os epítomos *non-self* reduzindo assim a possibilidade dos efeitos colaterais nos hospedeiros imunizados, além do mais o facto de ser uma proteína intracelular sugere baixo risco para induzir respostas autoimunes (Canales *et al.*, 2009; Moreno-Cid *et al.*, 2011). O que deveria ter sido feito para melhorar este trabalho de forma a ficar mais robusto e a preencher algumas lacunas nos resultados, seria o seguinte: (i) utilizar murganhos da estirpe CD-1 para verificar se os efeitos sob o mosquito *An.gambiae* s.s.; (ii) realizar ensaios de alimentação artificial, e assim esclarecer se a ausência de efeitos sobre este vetor se deve a problemas genéticos relacionados com a estirpe de murganhos BALB/C, ou à ineficácia do antígeno usado nas vacinações; (iii) repetir o ensaio de alimentação natural com grupos de mosquitos diferentes, para avaliar infecção e oviposição,; (v) tentar expressar a proteína recombinante em *E. coli* e testar diferentes formulações para a vacina.

Em conclusão, os nossos resultados comprovam a importância do gene *akirin* sugerindo que a akirin está envolvida na regulação da resposta do sistema imunológico contra plasmódios. Os dados obtidos no ensaio de silenciamento indicam que a proteína akirin parece ser um bom candidato a antígeno protetor contra o mosquito *An. gambiae* s.s., mas os resultados obtidos nos ensaios de vacinação e alimentação natural, não permitem avaliar se a proteína akirin poderá ser um bom candidato a integrar uma vacina contra a malária.

No caso específico da malária, na última década os enormes avanços técnicos, aliado ao sequenciamento do genoma do vector e do parasita e o desenvolvimento de técnicas moleculares como RNAi, ou a manipulação genética do vector, tem colocado a comunidade científica em posição de identificar não só as interações entre o parasita da

malária e o vetor, mas também desenvolver estratégias para manipular essas interações para controlar a doença. Uma dessas estratégias passa pela pesquisa de antígenos que possam revelar-se protetores contra a malária.

As metodologias baseadas em antígenos ocultos do mosquito têm muitas vantagens sobre as outras vacinas baseadas em antígenos do parasita. Tal como a vacina bem-sucedida contra as carraças, a Bm86, as proteínas como a akirin ou a sua ortóloga subolesin são imunologicamente ocultos enquanto antígenos, o que sugere não haver seleção da variabilidade antigénica, como existe no caso dos parasitas que circulam entre o vetor e os hospedeiros vertebrados (Lal *et al.*, 2001). Alguns investigadores podem sugerir que a aplicação da pressão imunológica nas populações naturais de mosquitos pode levar à seleção de mosquitos variantes, contudo as pressões seletivas no caso de uma vacina baseada na proteína recombinante akirin seriam dirigidas somente contra os mosquitos com esses fenótipos que são suscetíveis a uma perda do *fitness* mediada por anticorpos, ou seja, não seria uma pressão seletiva contra os parasitas (Lal *et al.*, 2001), não havendo a ocorrência por isso de uma resistência à vacina.

Os estudos associados ao desenvolvimento de uma vacina universal baseada na subolesin/akirin para o controlo de vetores e transmissão de agentes patogénicos, são ainda diminutos (de la Fuente *et al.*, 2011). No futuro, é importante dirigir novas linhas de investigação que permitam por exemplo, compreender melhor a importância da akirin na interação do plasmódio com o mosquito vetor, analisar os epítomos mais imunogénicos destas proteínas e estudar a diversidade e divergência evolutivas do gene *akirin/subolesin* entre indivíduos, espécies e regiões geográficas,

A eficácia obtida com estas vacinas poderá ser melhorada através da utilização de quimeras de epítomos e combinações de antígenos para o controlo de múltiplas espécies de insetos/artropodes vetores e dos agentes patogénicos associados.

As vacinas associadas a outro tipo de medidas integradas num plano de controlo bem organizado, constituirão um forte contributo para o controlo de infestações de vetores e transmissão de agentes patogénicos aos hospedeiros vertebrados. Para isso é necessário, também, o desenvolvimento de processos custo-efetivos para produção de vacinas e desenho de estratégias efetivas para administração das mesmas aos hospedeiros reservatórios e populações de animais em risco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayala, F.J., Escalante, A.A., Lal, A.A., & Rich, S.M. 1998. Evolutionary relationships of human malaria parasites. In: *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection*, Sherman, W.I. American Society for Microbiology Press, Washington, pp. 285-300.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. & Mukherjee, S.k., 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), pp. 657-685.
- Beutler, B. & Moresco, E.M., 2008. Akirins versus Infection. *Nature Immunology*, 9(1), pp. 7-9.
- Ballou, W., Arevalo-Herrera, M., Carucci, D., Richie, T.L., Corradin, G., Diggs, C., Druilhe, P., Giersing, B.K., Saul, A., Heppner, D.G., Kester, K.E., Lanar, D.E., Lyon, J., Hill, A.V.S., Pan, W. & Cohen, J.D., 2004. Update on the Clinical Development of Candidate Malaria Vaccines. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 71(supl.2), pp. 239-247.
- Carla, A.S., 2008. Malaria vectorial capacity and competence of *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927 (Diptera, Culicidae): Implications for the potential re-emergence of malaria in Portugal. Tese de doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- Cox, F.E., 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors*, 3 (1), pp. 5.
- Christophides, G., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P., Collins, F., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N., Hoffmann, J., Kanzok, S., Letunic, I., Levashina, E., Loukeris, T., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L., Muller, H.M., Osta, M., Paskewitz, S., Reichhart, J. M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P. & Kafatos, F., 2002. Immunity-Related Genes and Gene Families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298, pp. 159-165.
- Canales, M., Naranjo, V., Almazan, C., Molina, R., Tsuruta, S.A., Szabo, M.P., Manzano-Román, R., Perez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Jimenez, M.I., Lucientes, J., Villar, M. & de la Fuente, J., 2009. Conservation and immunogenicity of the

mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitology Research*, 105 (1), pp 97-111.

Coetzee, M., Craig, M. & Sueur, D., 2000. Distribution of African Malaria Mosquitoes Belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*, 16 (2), pp. 74-77.

Coetzee, M., 2004. Distribution of the African Malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70 (2), pp. 103-104.

Chiodini, P.L., Moody, A.H. & Manser, D.W., 2001. Malaria parasites. In: *Atlas of Medical Helminthology and Protozoology*. 4th Edition. Churchill Livingstone, London, pp.61-69.

de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazan, C. & Blouin, E.F., 2011. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Veterinary Parasitology*, 181 (1) , pp. 17-22.

DasGupta, R., 2005. Functional Genomic Analysis of the Wnt- Wingless Signaling Pathway. *Science*, 308 (5723), pp. 826-833.

Dong, Y., Aguilar, R., Xi, Z., Warr, E., Mongin, E. & Dimopoulos, G., 2006. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLOS pathogens*, 2 (6), pp. 513-525.

Foy, B., Killeen, G., Magalhaes, T. & Beier, J., 2002. Immunological Targeting of Critical Insect Antigens. *American Entomologist*, 48 (3), pp. 150-158.

Florens, L., Washburn, M., Raine, J., Anthony, R., Grainger, M., Haynes, J., Moch, J., Muster, N., Sacci, J., Tabbi, D., Whitney, A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M., Holder, A., Sinden, R., Yates, J. & Carucci, D., 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle . *Nature*, 419, pp. 520-526.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. & Mello, C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, pp. 806-811.

- Goto, A., Matsushita, K., Gesellchen, V., El Chamy, L., Kutteneuler, D., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., Akira, S., Boutros, M. & Reichhart, J.M., 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-KappaB- dependent gene expression in *Drosophila* and mice. *Nature Immunology*, 9 (1), pp. 97-104.
- Garver, L.S., Bahia, A., Das, S., Souza-Neto, J.A., Shiao, J., Dong, Y. & Dimopoulos, G., 2012. *Anopheles* Imd Pathway Factors and Effectors in Infection Intensity-Dependent Anti-*Plasmodium* Action. *PLOS pathogens*, 8 (6), pp. 1-11.
- Gulia, M., Suneja, A., & Gakhar, S.K., 2002. Effect of Anti-Mosquito Hemolymph Antibodies on Fecundity and Infectivity of Malarial Parasite *Plasmodium vivax* to *Anophles stephensi*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 55, pp. 78-82.
- Girard, M.P., Reed, Z.H., Friede, M. and Kieny, M.P., 2007. A review of human vaccine research and development malaria. *Vaccine*, 25 (9), pp. 1567-1580.
- Guerin, P., Olliaro, P., Nosten, F., Druilhe, P., Laxminarayan, R., Binka, F., Kilama, W., Ford, N. & White, N., 2002. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *The Lancet infectious diseases*, 2 (9), pp. 564-573.
- Galindo, R., Doncel-Perez, E., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Gortazar, C., Mangold, A.J., Martin-Hernando, M.P., Kocan, K.M. & de la Fuente, J., 2009. Tick subolesin is a ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, 33 (4), pp. 612-617.
- Hillyer, J.F., 2010. Mosquito Immunity. In: *Invertebrate Immunity*. Söderhäll, K. (Ed.). Springer, New York, pp.218-238.
- Hay, S., Guerra, C., Tatem, A., Noor, A. & Snow, R., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet infectious diseases*, 4 (6), pp. 327-336.
- Leids Universitair Medisch Centrum, 2012. [online] Disponível em <http://www.lumc.nl/con/1040/81028091348221/810281121192556/811070740182556/811070744452556/#Rodent%20malaria%20parasites%20as%20models%20for%20human%20malaria> [Consultado 6 de Maio de 2012];

- Lowenberger, C.A., Kamal, S., Chiles, J., Paskewitz, S., Bulet, P., Hoffmann, J.A. & Christensen, B.M., 1999. Mosquito-*Plasmodium* Interactions in Response to Immune Activation of the Vector. *Experimental Parasitology* 91, pp. 59-69.
- Langhorne, J., Buffet, P., Galinski, M., Good, M., Harty, J., Leroy, D., Mota, M.M., Pasini, E., Renia, L., Riley, E., Stins, M. & Duffy, P., 2011. The relevance of non-human and rodent malaria models for humans. *Malaria Journal*, 10 (1), pp. 23-26.
- Loaiza, J. R., Bermingham, E., Sanjur, O. I., Scott, M.E., Bickersmith, S.A. and Conn, J.E., 2012. Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae : Anophelinae). *Infection, Genetics and Evolution*, 12, pp. 1-12.
- Moreno-Cid, J.A., Jiménez, M., Cornelie, S., Molina, R., Alarcón, P., Lacroix, M-N., Pinal, R., Delacour, S., Lucientes, J., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Villar, M. & de la Fuente, J., 2010. Characterization of *Aedes albopictus* akirin for the control of mosquito and sand fly infestations. *Vaccine*, 29 (1), pp. 77-82.
- Michel, K. & Kafatos, F.C., 2005. Mosquito immunity against *Plasmodium*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (7), pp. 677-689.
- Manzano-Román, R., Díaz-MARTín, V., Oleaga, A., Siles-Lucas, M. & Pérez-Sánchez, R., 2011. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Veterinary Parasitology*, 185 (24), pp. 248-259.
- Nowak, S.J., Aihara, H., Gonzalez, K., Nibu, Y. & Baylies, M.K., 2012. Akirin Links Twist-Regulated Transcription with the Brahma Chromatin Remodeling Complex during Embryogenesis. *PLOS genetics*, 8 (3), pp. 1-16.
- Philips, R.S., 2001. Current Status of malaria and potential for control. *Clinical Microbiology reviews*, 14 (1), pp. 208-226.
- Qiu, Y.T., Smallegange, R.C., Van Loon, J.J.A. & Takken, W., 2011. Behavioural responses of *Anopheles gambiae sensu stricto* to components of human breath, sweat and urine depend on mixture composition and concentration. *Medical and Veterinary Entomology*, 25 (3), pp. 247-255.
- Raikhel, A.S., 1987. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82 (suppl. III), pp. 93-101.
- Richards, O.W., & Davies, R.G., 1977. *Imm's general book of entomology II: General*

classification and biology. Chapman and Hall, New York. 1354 pp.

Sutterwala, F.S., & Flavell, R.A., 2008. Immunology: cascade into clarity. *Nature*, 451 (7176), pp. 254-255.

Stoute, J., Kester, K., Krzych, U., Welde, B., Hall, T., White, K., Glenn, G., Ockenhouse, C., Garcon, N., Schwenk, R., Lanar, D., Sun, P., Momin, P., Wirtz, R.A., Golenda, C., Slaoui, M., Wortmann, G., Holland, C., Dowler, M., Cohen, J. & Ballou, W., 1998. Long-Term Efficacy and Immune Responses following Immunization with the RTS,S Malaria Vaccine. *The Journal of infectious diseases*, 178 (4), pp. 1139-1144.

Schwartz, L., Brown, G.V., Genton, B. & Moorthy, V.S., 2012. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malaria Journal*, 11, pp.1-22.

Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E. & Hay, S.I., 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5, pp. 69-80.

Sinden, R.E., Alavi, Y. & Raine, J.D., 2004. Mosquito-malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 (7), pp. 625-629.

Schmidt, R.L., Trejo, T.R., Plummer, T.B., Platt, J.L. & Tang, A.H., 2007. Infection-induced proteolysis of PGRP-LC controls the IMD activation and melanization cascades in *Drosophila*. *The FASEB Journal*, 22 (3), pp. 918-929.

Sappington, T.W., Kokoza, V.A., Cho, W-L. & Raikhel, A., 1996. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, pp. 8934-8939.

Tyagi, R.K., Garg, N.K. & Sahu, T., 2012. Vaccination Strategies against Malaria: Novel carrier(s) more than a tour de force. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 162 (1), pp. 242-254.

Wan, F. & Lenardo, M.J., 2010. The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Research*, 20 (1), pp. 24-33.

World Health Organization, 2011. *World Malaria Report 2011*. Geneva, 246 pp.

Zou, Z., Shin, S.W., Alvarez, K.S., Bian, G., Kokoza, V. & Raikhel, A.S., 2008. Mosquito RUNX4 in the immune regulation of PPO gene expression and its effect on avian malaria parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (47), pp. 18454-18459.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Mapa representativo da distribuição da malária, a nível mundial	4
Figura 1.2 Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i> spp. onde se representam dois hospedeiros o Homem e o mosquito.....	6
Figura 1.3 Distribuição global dos principais vetores de malária	8
Figura 1.4 Fêmeas de <i>Anopheles. Gambiae s.s.</i> : alimentação num hospedeiro	10
Figura 1.5 Comparação entre o efeito previsto do uso de uma vacina contra o mosquito e uma vacina de bloqueio de transmissão no caso do vetor da malária numa vila na Tanzânia.....	15
Figura 1.6 Resposta imune no hemocélio do mosquito	18
Figura 1.7 Hemeócitos e fatores da resposta imunológica no hemocélio do mosquito, observação por microscopia eletrónica.....	20
Figura 1.8 Homologia do sistema imunitário entre os mamíferos e a maioria dos insetos	23
Figura 1.9 Regulação nuclear do fator NF-kB.....	25
Figura 1.10 Localização Nuclear da proteína Akirin.....	27
Figura 1.11 Akirins são proteínas altamente conservadas.....	28
Figura 1.12 Moscas mutantes para <i>akirin</i> exibem diferentes fenótipos musculares nos embriões.....	29
Figura 1.13 Árvore filogenética que demonstra o alto grau de conservação entre o gene <i>subolesin</i> das carraças e o gene <i>akirin</i> dos insetos e vertebrados	30
Figura 2.1 Murganhos anestesiados durante a alimentação de mosquitos	37

Figura 2.2 Desenho experimental da alimentação natural e artificial, dos mosquitos <i>Anopheles gambiae</i> s.s. em murganhos BALB/C	38
Figura 2.3 Imunização de murganhos. Inoculação intraperitoneal num murganho BALB/C	39
Figura 2.4 Técnica de ELISA indireta	39
Figura 2.5 Esquema das diluições seriadas do antígeno (Ag) e do soro do animal imunizado (anticorpo primário), para determinação do título de anticorpos.....	40
Figura 2.6 Mecanismo geral de funcionamento do modelo de RNA de interferência através do RNA de cadeia dupla (dsRNA)	41
Figura 2.7 Fotografia de um gel de agarose a 1,5% após electroforese de 1 uL de amostras de dsRNA dos genes <i>akirin</i> e <i>b2m</i>	42
Figura 2.8 Microinjeção dsRNA no tórax de um mosquito fêmea <i>An. gambiae</i> s.s.	43
Figura 3.1 Resposta dos anticorpos nos murganhos BALB/C durante as 4 imunizações	48
Figura 3.2 Efeito dos anticorpos anti-akirin em <i>An. gambiae</i> s.s., 8 dias após a refeição em murganhos infetados com <i>P. berghei</i>	49
Figura 3.3 Efeito dos anticorpos na oviposição diária de mosquitos <i>An. gambiae</i> s.s..	51
Figura 3.4 Efeito dos anticorpos anti-akirin na produção de ovos em mosquitos <i>An.gambiae</i> s.s.	51
Figura 3.5 Efeito dos anticorpos anti-akirinna sobrevivência de mosquitos <i>An.gambiae</i> s.s.	52
Figura 3.6 Taxas de silenciamento do gene <i>akirin</i> , medidas por RT-qPCR.....	53
Figura 3.7 Níveis de mRNA akirin no controlo (injetado com dsRNA B2M) e no grupo silenciado (injetado com dsRNA Akirin).	55

Figura 3.8 Gel SDS-PAGE realizado com os extratos proteicos dos <i>pools</i> de corpo gordo dos mosquitos silenciados e dos mosquitos controlo, para análise de densitometria.....	56
Figura 3.9 Correlação entre o silenciamento analisado por RT-qPCR e o silenciamento analisado por densitometria no gel SDS-PAGE	57
Figura 3.10 Análise do efeito do silenciamento do gene <i>akirin</i> na infeção com <i>P.berghei</i> 8 dias após a refeição infetante para os mosquitos <i>An. gambiae</i> s.s.	58
Figura 3.11 Taxa de infeção 8 dias após a refeição infetante em mosquitos silenciados (dsRNA Akirin) e mosquitos controlo (dsRNA B ₂ M).....	59
Figura 3.12 Correlação entre a taxa de silenciamento no intestino médio e a taxa de infeção nos mosquitos em cada réplica biológica.....	60
Figura 3.13 Efeito do silenciamento na produção de ovos em mosquitos <i>An.gambiae</i> s.s.	61
Figura 3.14 Correlação entre o silenciamento no corpo gordo e a inibição da produção de ovos	62
Figura 3.15 Ovos com desenvolvimento incompleto e ovos completamente desenvolvidos.....	62
Figura 3.16 Efeito do silenciamento na sobrevivência de mosquitos <i>An.gambiae</i> s.s. .	64
Figura A1	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.A Estudos preliminares realizados com Akirin e subolesin, com o objetivo de avaliar a sua capacidade como vacinas anti-vetores	32
Tabela 3.A Efeito dos anticorpos anti-akirin no desenvolvimento da infecção por <i>P.berghei</i> em <i>An. gambiae s.s.</i>	50
Tabela 3.B Efeito dos anticorpos anti-akirin na oviposição e na produção de ovos pelas fêmeas <i>An.gambiae s.s</i>	52
Tabela 3.C Comparação dos resultados da análise densitométrica dos extratos proteicos de corpo gordo e dos resultados de silenciamento obtidos a partir dos níveis de mRNA dos <i>pools</i> de corpo gordo	56
Tabela 3.D Efeito do silenciamento do gene que codifica a akirin na intensidade de infecção por <i>P.berghei</i>	59
Tabela 3.E Resumo dos dados referentes aos efeitos do silenciamento na produção de ovos das fêmeas <i>An. gambiae s.s</i>	63
Tabela 3.F Taxas de sobrevivência em cada uma das 4 réplicas biológicas, com as respectivas percentagens de inibição da sobrevivência.....	64
Tabela A. Soluções utilizadas na realização da técnica de ELISA indireta.....	88
Tabela B. Condições de amplificação do gene <i>b2m</i> para PCR simples.....	88
Tabela C. Condições de amplificação do gene akirin para PCR simples e para Real Time-PCR	89
Tabela D. Condições de amplificação do gene <i>s7</i> para Real Time – PCR	89
Tabela E. Condições de amplificação dos genes <i>akirin</i> e <i>s7</i> para RT – qPCR realizado num passo	90

Tabela F. Reagente e respectivas concentrações utilizadas para amplificar os genes por PCR.....	91
Tabela G. Reagente e respectivas concentrações utilizadas para amplificar os genes por PCR.....	92
Tabela H. Reagentes utilizados na reação de RT-qPCR de um passo e respectivas concentrações.....	92
Tabela I. Reagentes utilizados na reação de PCR em tempo real e as respectivas concentrações.....	93
Tabela J. Soluções utilizadas para realizar a técnica SDS-PAGE.....	93
Tabela K. Intensidade de infecção e produção de ovos, dos mosquitos utilizados para fazer <i>pools</i> de corpo gordo.....	94
Tabela L. Comparação da infecção entre o grupo controlo e o grupo silenciado, nas 4 experiências de silenciamento	96
Tabela M. Comparação na produção de ovos entre o grupo controlo e o grupo silenciado, nas 4 experiências de silenciamento	97

ANEXOS

Tabela A. Soluções utilizadas na realização da técnica de ELISA indireta.

Soluções		
	Reagentes	Quantidade
Solução de lavagem (TBS-T)	ddH ₂ O	-
	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,05 %
Solução de Bloqueio	TBS-T	1X
	Leite em pó magro	5%
Tampão de Diluição do Substrato pH 8.5	H ₂ O	-
	Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	50 mM
	Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .6H ₂ O)	5 mM

Tabela B. Condições de amplificação do gene *b2m* para PCR simples.

Gene	Passo		Temperatura (°c)	Tempo
ds_b2m	Desnaturação inicial		94	4 min
	Desnaturação	35 ciclos	94	30 seg
	Annealing		62	45 seg
	Extensão		72	1 min
	Extensão final		72	10 min

Tabela C. Condições de amplificação do gene *akirin* para PCR simples e para *Real Time*-PCR.

Gene	Passo		Temperatura (°c)	Tempo
<i>ds_akirin</i> (ds6809)	Desnaturação inicial		94	4 min
	Desnaturação	40 ciclos	94	1 min
	<i>Annealing</i>		52	1 min
	Extensão		72	1 min
	Extensão final		72	10 min
Gene	Passo		Temperatura (°c)	Tempo
<i>akirin</i> PCR em Tempo Real	Desnaturação inicial		95	10 min
	Desnaturação	40 ciclos	95	10 seg
	<i>Annealing</i>		63.5	45 seg
	Extensão	80 ciclos	60	10 seg

Tabela D. Condições de amplificação do gene *s7* para *Real Time* – PCR. O filtro de fluorescência utilizado foi o adequado para ler FAM 6.

Gene	Passo		Temperatura (°c)	Tempo
<i>S7</i> PCR em Tempo Real	Desnaturação inicial		95	10 min
	Desnaturação	40 ciclos	95	10 seg
	<i>Annealing</i>		62	45 seg
	Extensão	80 ciclos	60	10 seg

Tabela E. Condições de amplificação dos genes *akirin* e *s7* para RT – qPCR realizado num passo. O filtro de fluorescência utilizado foi o adequado para ler FAM 6.

Genes	Passo		Temperatura (°C)	Tempo
<i>akirin e S7</i> RT-qPCR (1 passo)	cDNA síntese		50	10 min
			95	5 min
	Desnaturação	40 ciclos	95	10 seg
	Annealing		60	30 seg

Tabela F. Reagente e respectivas concentrações utilizadas para amplificar os genes por PCR.

Primer	Vectorbase (nº de acesso)	Sequência (5' para 3')	Tamanho do Produto (pb)
ds6809_Fwd	AGAP006809	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTACT</u> TTGGCAGTCGTTGTAGTTGC	509
ds6809_Rev		<u>TAATACGACTCACTATAGGGTACT</u> CACCTGCTTGAAGGTGAACA	
dsb2m_Fwd	GenBank: NM_009735	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> CCCCCACTGAGACTGATACA	447
dsb2m_Rev		<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> CCCCCACTGAGACTGATACA	
S7_RT_Fwd	AGAP010592	GCCATCCTGGAGGATCTGGTA	132
S7_RT_Rev		CGATGGTGGTCTGCTGTTCTTATCC	
6809_RT_Fwd	AGAP006809	CCCTGTTCACCTTCAAGCAG	95
6809_RT_Rev		GGTCAGCACGGCATCATACT	

Tabela G. Reagente e respectivas concentrações utilizadas para amplificar os genes por PCR.

Reagentes PCR	Concentração final
ddH ₂ O	-
Tampão (Promega)	1 X
Cloreto de Magnésio (Promega)	25 mM
dNTP's (Promega)	10 mM
Primer <i>foward</i> e <i>reverse</i>	
<i>Taq DNA Polimerase</i> (Promega)	5 U/uL
<i>DNA template</i>	1 uL
Volume final	20 uL

Tabela H. Reagentes utilizados na reação de RT-qPCR de um passo e respectivas concentrações.

Reagentes <i>iScript One-Step RT-PCR kit With SYBR Green</i>	Concentração final
<i>2x SYBR Green RT-PCR reaction mix</i>	1 X
Primer <i>foward</i> e <i>reverse</i>	300 nM
ddH ₂ O	-
RNA <i>template</i> (1 pg a 100 ng)	-
<i>iScript reverse transcriptase for one-step RT-PCR</i>	200 U/uL
Volume final	50 uL

Tabela I. Reagentes utilizados na reação de PCR em tempo real e as respectivas concentrações.

<i>Reagentes iQ SYBR Green Supermix</i>	Concentração final
<i>2x SYBR Green RT-PCR reaction mix</i>	1 X
<i>Primer forward e reverse</i>	50 mM
<i>ddH₂O</i>	-
<i>RNA template (1 pg a 100 ng)</i>	-
<i>iScript reverse transcriptase for one-step RT-PCR</i>	200 U/uL
Volume final	20 uL

Tabela J. Soluções utilizadas para realizar a técnica SDS-PAGE.

Soluções		
	Reagentes	Quantidade
Tampão de corrida	ddH ₂ O	-
	Tris-HCl pH 8.8	25 mM
	Glicina	200 mM
	SDS	0,1 % (p/v)
Tampão de amostra	Laemmli <i>Sample buffer</i> (BioRad)	1X
	Beta-mercapto-etanol	5%

Tabela K. Intensidade de infecção e produção de ovos, dos mosquitos utilizados para fazer *pools* de corpo gordo.

3º Silenciamento	Pool	Nº Ovos	Nº Oocistos	4º Silenciamento	Pool	NºOvos	Nº Oocistos
	Akirin Corpo gordo	0	93		Akirin Corpo gordo <i>pool</i> 1	2	81
		12	32			7	20
		22	117			0	1
		41	226			54	107
		0	81			9	120
	Controlo Corpo gordo	0	116		Akirin Corpo gordo <i>pool</i> 2	0	0
14		10	0	0			
34		67	0	0			
58		3	0	0			
46		65	0	0			
4º Silenciamento							
Controlo Corpo gordo	36	39		Controlo Corpo Gordo	45	126	
	41	33			75	2	
	66	45			36	38	
	69	94			0	0	
	76	48			0	0	
	55	31			56	48	
	0	0			83	41	
	81	179					

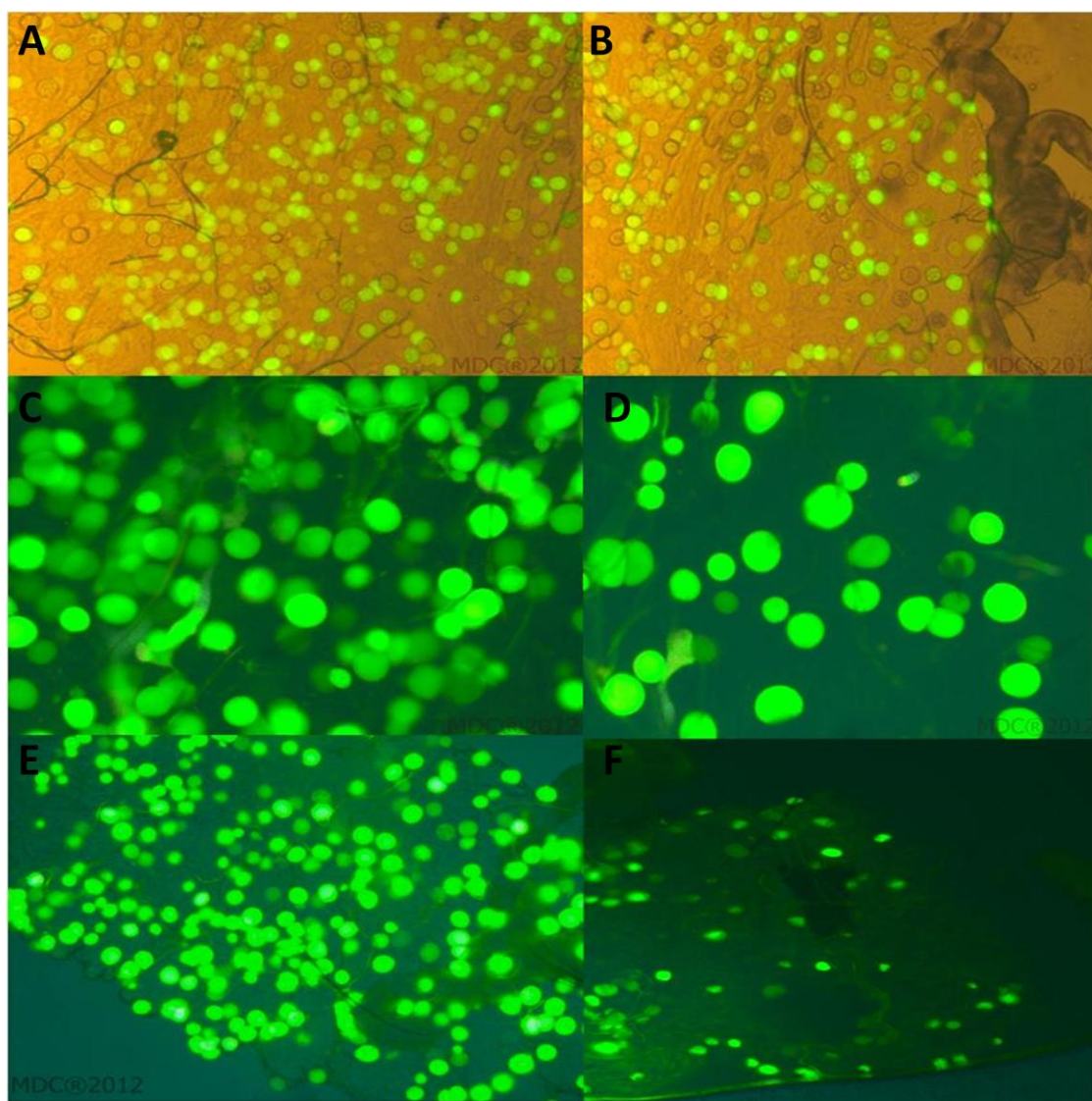


Fig. A 1 Intestinos médios de *Anopheles gambiae* s.s. infectados com *Plasmodium berghei*. As figuras A, C e E correspondem à infecção por oocistos em mosquitos silenciados para a akirin; B, D e F correspondem à infecção por oocistos em mosquitos controlo. As imagens A, B, E e F estão ampliadas 20x; as imagens C e D estão ampliadas 40x.

Tabela L. Comparação da infecção entre o grupo controle e o grupo silenciado, nas 4 experiências de silenciamento.

Comparação das Intensidades de Infecção											
Grupo	N	Mín	Máx	Média	Mediana	p ⁽¹⁾	%Taxa de infecção	%Aumento intensidade infecção ⁽³⁾	p ⁽²⁾	%Silenciamento Intestino médio	Resto do corpo
1ª Experiência											
Controlo	32	0	136	19,66	9,50		59				
Akirin	44	0	280	41,48	15,50	<0,05	68	51	>0,05	34,0246	-
2ª Experiência											
Controlo	79	0	145	23,77	6		59				
Akirin	73	0	219	28,16	10	>0,05	66	14	>0,05	39,29026	-
3ª Experiência											
Controlo	87	0	199	48,89	40		84				
Akirin	76	0	235	59,78	39	>0,05	82	18	>0,05	4,7362	36%
4ª Experiência											
Controlo	95	0	201	36,63	31		66				
Akirin	84	0	385	77,79	64,50	<0,0001	78	53	<0,0001	15,91036	46%

(1) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o control usando o teste não paramétrico de MW; (2) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o control usando o teste Kolmogorov-Smirnov; (3) $100 \times [(m\acute{e}dia\ akirin - m\acute{e}dia\ controlo) / m\acute{e}dia\ akirin]$;

Tabela M. Comparação na produção de ovos entre o grupo controle e o grupo silenciado, nas 4 experiências de silenciamento.

Comparação Número de Ovos									
Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾	% Ovos atrofiados ⁽³⁾	% Inibição produção de ovos ⁽⁴⁾
1ª Experiência									
Controlo	32	0	92	23,28	4,50	>0,05	>0,05	36	56%
Akirin	44	0	68	10,09	0			43	
2ª Experiência									
Controlo	79	0	93	25,62	16	<0,05	>0,05	10	35%
Akirin	73	0	97	17,18	0			27	
3ª Experiência									
Controlo	87	0	92	26,37	22	>0,05	>0,05	39	23%
Akirin	76	0	78	20,11	17,50			24	
4ª Experiência									
Controlo	95	0	98	28,27	28	<0,05	<0,05	14	32%
Akirin	84	0	62	19,13	12			27	

(1) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o control usando o teste não paramétrico de MW; (2) valores de p para a comparação entre os mosquitos tratados com dsAkirin e o control usando o teste Kolmogorov-Smirnov; (3) $100 \times [(méd\text{ia control}o - méd\text{ia akirin}) / méd\text{ia control}o]$; (4) $100 \times [(méd\text{ia control}o - méd\text{ia akirin}) / méd\text{ia control}o]$

